

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANBIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE PLGA
CONTENDO O QUIMIOTERÁPICO LAPATINIBE

CRISTIANE DA LUZ COSTA

BRASÍLIA

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E
NANBIOTECCNOLOGIA

CRISTIANE DA LUZ COSTA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE PLGA
CONTENDO O QUIMIOTERÁPICO LAPATINIBE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Nanociências e Nanobiotecnologia pelo programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

BRASÍLIA

2018

CRISTIANE DA LUZ COSTA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLGA
CONTENDO O QUIMIOTERÁPICO LAPATINIBE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Nanociências e Nanobiotecnologia pelo programa de Pós-Graduação em Nanociências e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.

Aprovada em: 14/ 11/ 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes – Presidente
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Camila Alves Areda
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à minha mãe Maria Antônia, meu irmão Cleyton e ao meu pai Jerusimar. E dedico também ao meu orientador Dr. Anderson.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela força, sabedoria e coragem; e por ter me ajudado a superar todos os obstáculos que apareceram durante o caminho. Obrigada meu Senhor e meu Deus!

À minha mãe Maria Antônia, ao meu pai Jerusimar e ao meu irmão Cleyton, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e por sempre acreditarem no meu potencial. Em especial a minha mãe, pois sem ela ao meu lado tenho certeza que tudo seria muito mais difícil. Muito obrigada!

Aos meus orientadores Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes e Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes por todo ensinamento, orientação, paciência e disponibilidade ao longo desses dois anos. Gratidão eterna!

Aos membros do laboratório de fotoquímica por todo conhecimento compartilhado e em especial ao doutorando Antonio pelas dicas e auxílio na utilização de alguns equipamentos.

Aos técnicos do laboratório da FCE, em especial a Diego Juscelino Santos Dias e Ieri de Sousa Braga Júnior.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de forma direta e indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

O câncer não é uma doença, mas muitas. Podemos chamar todas da mesma maneira porque compartilham uma característica fundamental: o crescimento anormal das células (MUKHERJEE, 2010).

RESUMO

O câncer, também denominado de neoplasia maligna, é causado pela transformação de uma célula normal em tumoral. O câncer de mama é, atualmente, considerado o segundo tipo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. O diagnóstico do câncer de mama em estágio inicial possibilita um tratamento mais efetivo e menos agressivo, porém a maioria dos casos é diagnosticada em estágio avançado reduzindo assim as chances de sobrevivência por isto, é tão importante o diagnóstico precoce para que se evite o processo de metástase. Neste trabalho utilizamos como fármaco de estudo o lapatinibe, que é um fármaco usado no tratamento do câncer de mama avançado e metastizado. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas de PLGA, contendo este quimioterápico e funcionalizando o mesmo com leucina, visando desenvolver um sistema de encapsulamento e direcionamento de fármaco para futura aplicação no tratamento de câncer. As nanopartículas foram preparadas pelo método de evaporação do solvente e foram funcionalizadas por acoplamento com EDC/NHS para em seguida adicionar a leucina na superfície das partículas. As técnicas utilizadas para a caracterização das nanopartículas foram: espectroscopia na região do UV-vis, emissão de fluorescência e FTIR. O tamanho da partícula foi determinado por espalhamento dinâmico de luz e a morfologia pelo MEV. Os resultados mostraram que eficiência de encapsulamento foi de 95,17% e os espectros de FTIR confirmam o encapsulamento do fármaco e a interação da nanopartícula com a leucina comprovando assim a funcionalização. Conclui-se que as nanopartículas produzidas neste trabalho são estruturas promissoras para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para o tratamento do câncer.

Palavras-chaves: nanopartícula, PLGA, câncer de mama, lapatinibe, funcionalização.

ABSTRACT

Cancer, also called malignant neoplasm, is caused by the transformation of a normal cell into a tumor. Breast cancer is currently considered the second most frequent type in the world and the most common among women. The diagnosis of early stage breast cancer allows for a more effective and less aggressive treatment, but most cases are diagnosed at an advanced stage, thus reducing the chances of survival because of this, it is so important the early diagnosis to avoid the process of metastasis. In this study we used as study drug lapatinib, which is a drug used in the treatment of advanced and metastatic breast cancer. The objective of this work was to develop and characterize PLGA nanoparticles, containing this chemotherapeutic and functionalizing the same with leucine, aiming to develop a system of encapsulation and drug targeting for future application in the treatment of cancer. The nanoparticles were prepared by the solvent evaporation method and were functionalized by coupling with EDC / NHS to then add the leucine on the surface of the particles. The techniques used to characterize the nanoparticles were: spectroscopy in the UV-vis region, fluorescence emission and FTIR. Particle size was determined by dynamic scattering of light and morphology by SEM. The results showed that encapsulation efficiency was 95.17% and FTIR spectra confirmed the encapsulation of the drug and the interaction of the nanoparticle with leucine, thus confirming functionalization. It is concluded that the nanoparticles produced in this work are promising structures for the development of new pharmaceutical forms for the treatment of cancer.

Key words: nanoparticle, PLGA, breast cancer, lapatinib, functionalization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1. Progressão metastática do câncer.....	6
Figura 2. Estrutura química do lapatinibe.....	9
Figura 3. Mecanismo de ação do lapatinib.....	10
Figura 4. Estruturas moleculares de a) L-PLA - ácido lático levógero; b) D-PLA - ácido lático dextrógeno; c) PGA - ácido glicólico e d) PLGA - Poli (lático-e-ácido glicólico), sendo que x= número de unidades de ácido lático e y= número de unidades de ácido glicólico.....	13
Figura 5. Papéis dos aminoácidos na nutrição e homeostase de todo organismo...	19
Figura 6. Estrutura química da leucina.....	20
Figura 7. Reação química entre os grupos do ácido carboxílico (do PLGA) e amina (da leucina) ativada por EDC e estabilizada por NHS.....	32
Figura 8. Curva de calibração, feita no UV-vis, para determinação da concentração do lapatinibe.....	34
Figura 9. Espectros de absorção na região do UV-vis das amostras de LPT (laranja), NPL (azul) e NPLF (rosa).....	36
Figura 10. Espectros de absorção na região do UV-vis das amostras de LEU (lilás) e NPLF (rosa) para comprovação da funcionalização.....	36
Figura 11. Curva de calibração, feita no espectro fluorímetro, para determinação da concentração do lapatinibe.....	37
Figura 12. Gráfico da emissão de fluorescência nas primeiras 2 h 30 min (equivalente a 9000 s) com intervalo de 5 segundos entre cada medida sendo realizada 1801 medidas.....	38
Figura 13. Gráfico da emissão de fluorescência do lapatinibe liberada por hora (min) correspondendo ao período de 12 dias sendo realizadas 162 medidas.....	38

Figura 14. Morfologia da superfície externa das micropartículas preparadas pelo método de evaporação do solvente. A) NPV com ampliação 15.000 X por MEV. Barra de 5,0 μm . BSED; B) NPL com ampliação 15.000 X por MEV. Barra de 4,0 μm . BSED; C) NPVF com ampliação 40.000 X por MEV. Barra de 1,0 μm . BSED; D) NPLF com ampliação 40.000 X por MEV. Barra de 1,0 μm . BSED.... 40

Figura 15. Gráficos do tamanho em função da intensidade das nanopartículas: (A) NPV, (B) NPVF, (C) NPL e (D) NPLF..... 42

Figura 16. Espectros, normalizados, de emissão de fluorescência das amostras de LPT (laranja), NPL (azul) e NPLF (rosa)..... 46

Figura 17. Espectros, normalizados, obtidos por FTIR das seguintes amostras: LPT (laranja), NPL (azul), NPLF (rosa) e NPV (vermelho) para análise do encapsulamento do fármaco..... 48

Figura 18. Espectros, normalizados, obtidos por FTIR das seguintes amostras: LEU (lilás), NPF (verde), NPLF (rosa) e NPV (vermelho) para análise da funcionalização das nanopartículas..... 48

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 para o sexo feminino, exceto pele não melanoma.....	2
Tabela 2. Modelos matemáticos para análise da cinética de liberação do fármaco	28
Tabela 3. Quantidade de emissão de fluorescência e concentração em seis momentos do ensaio de perfil de liberação para a nanopartícula contendo o fármaco lapatinibe.....	39
Tabela 4. Valor de R^2 determinado para cada modelo matemático de cinética de liberação da nanopartícula sem funcionalização.....	39
Tabela 5. Valores da média \pm desvio padrão do diâmetro hidrodinâmico, intensidade e índice de polidispersão das nanopartículas produzidas.....	41
Tabela 6. Classificação das partículas baseado no seu valor de Pdl.....	42
Tabela 7. Classificação das nanopartículas conforme o seu valor de potencial zeta.....	44
Tabela 8. Valores da média \pm desvio padrão do potencial zeta das nanopartículas	44
Tabela 9. Comprimentos de máxima emissão e intensidade dos espectros de lapatinibe e das nanopartículas com o lapatinibe.....	46
Tabela 10. Bandas de absorção no FTIR observadas para as amostras.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®: marca registrada

μL: microlitro

A: absorbância

b: caminho óptico da amostra

c: concentração do absorvente

DLS: Dynamic Light Scattering (Espalhamento de luz dinâmico)

DMSO: Dimetilsulfóxido

E.E.: Eficiência de Encapsulamento

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EGFR: receptores de fatores de crescimento epidérmico

et al.: e outros

FDA: Food and Drug Administration

FTIR: Fourier Transform Infrared (infravermelho com transformada de Fourier)

HCl: ácido clorídrico

HER1: receptores de fatores de crescimento epidérmico tipo 1

HER2: receptores de fatores de crescimento epidérmico tipo 2

in situ: no local

INCA: Instituto Nacional de Câncer

KBr: Brometo de potássio

kN: kilonewton

LEU: Leucina

LPT: Lapatinibe

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mg: miligrama

mL: mililitro

mV: milivolt

mW: Megawatt

NaOH: hidróxido de sódio

NHS: N-hidroxisuccinimida

nm: nanômetro

NP: nanopartícula

NPL: nanopartícula com lapatinibe sem funcionalização

NPLF: nanopartícula com lapatinibe funcionalizada

NPV: nanopartícula vazia sem funcionalização

NPVF: nanopartícula vazia funcionalizada

P.A.: Para análise

PBS: Phosphate Buffered Saline (Solução Tamponada de Fosfato)

PdI: Polydispersity Index (Índice de polidispersividade)

pH: potencial hidrogeniônico

PLGA: Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide Acid) (ácido poli(D,L-láctico-e-glicólico))

PVA: PolyVinyl Alcohol (álcool polivinílico)

rpm: rotações por minuto

UV-vis: Ultravioleta-visível

ϵ : absortividade molar

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de ilustrações	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
1. Introdução	1
1.1. Câncer.....	1
1.2. Câncer de mama.....	2
1.3. Lapatinibe.....	8
1.4. Sistema de liberação de fármacos e PLGA.....	11
1.5. Funcionalização de nanopartículas.....	14
1.6. A interação entre nanopartículas e proteínas.....	15
1.7. Leucina.....	18
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Materiais e métodos	22
3.1. Materiais.....	22
3.1.1. Reagentes.....	22
3.1.2. Equipamentos.....	23
3.1.3. Soluções.....	24
3.2. Métodos.....	25
3.2.1. Produção das nanopartículas.....	25
3.2.2. Funcionalização das nanopartículas.....	26
3.2.3. Caracterização das nanopartículas.....	26
3.2.3.1. Eficiência de encapsulamento.....	27
3.2.3.2. Espectrofotometria na região do UV-vis.....	27
3.2.3.3. Perfil e cinética de liberação.....	28
3.2.3.4. Tamanho e índice de polidispersão.....	29
3.2.3.4. Potencial zeta.....	29
3.2.3.5. Análise morfológica (MEV).....	29
3.2.3.6. Emissão de fluorescência.....	30
3.2.3.8. Espectrometria no infravermelho por transformações de Fourier (FTIR)	30

4.	Resultados e discussão	31
4.1.	Produção e funcionalização de nanopartículas.....	31
4.2.	Eficiência de encapsulamento.....	33
4.3.	Espectrofotometria na região do UV-vis.....	35
4.4.	Perfil e cinética de liberação.....	37
4.5.	Análise morfológica (MEV).....	39
4.6.	Tamanho e índice de polidispersão.....	40
4.7.	Potencial zeta.....	44
4.8.	Emissão de fluorescência.....	45
4.9.	Espectrometria no infravermelho por transformações de Fourier (FTIR)	47
5.	Conclusão	57
6.	Referências bibliográficas	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, a palavra câncer de origem latina (câncer) significando “caranguejo” deve ter sido empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A transformação da célula normal em tumoral ocorre por várias razões, destacando-se as induções por mutações espontâneas, as mutações estimuladas por produtos tóxicos provenientes do meio ambiente e hábitos pessoais, a sua incapacidade em reparar erros moleculares causados por mutações e, sobretudo, pela ineficiência imunológica em eliminar células tumorais (ROSENDAHL *et al.*, 2015).

O processo de carcinogênese é lento e gradativo, podendo demorar anos para o surgimento do tumor. Sendo que a partir da multiplicação descontrolada das células geneticamente modificadas, irá surgir o tumor (MARTINS, 2016).

As células malignas possuem a propriedade de se disseminar entre tecidos normais, formando tumores secundários, fato não observado em células benignas, e esse processo de deslocamento de células cancerígenas de um determinado local para outro, implicando na formação de um novo tumor neste local, é conhecido como metástase (PIACENTINI e MENEZES, 2012). Reconhecidas há mais de 100 anos, as metástases com formação dos tumores malignos estão associadas a aproximadamente 90% das mortes por câncer (CHAFFER e WEINBERG, 2011; IORIO *et al.*, 2009).

Considerando que a maioria dos pacientes portadores de câncer morre devido à presença de metástases e não por causa do tumor primário, é imprescindível, portanto, que os estudos avancem na elucidação dos mecanismos moleculares deste evento, de

maneira a encontrar alvos terapêuticos e prevenir a disseminação do câncer (SILVEIRA *et al.*, 2013). As células metastáticas podem repetir a sequência completa de eventos para produzir metástases adicionais (KIM *et al.*, 2009).

Segundo Mundy (2002), os pacientes com câncer de mama e próstata avançados quase sempre desenvolvem metástases ósseas e as chances são altas em comparação aos pacientes que foram originalmente diagnosticados com um desses dois tipos de cânceres, sendo que a maior parte do tumor no momento da morte estará no osso. As metástases ósseas são raramente silenciosas - elas são geralmente associadas à dor óssea grave, que pode ser intratável e os mecanismos responsáveis pela dor óssea são mal compreendidos, mas parece ser uma consequência de osteólise (degradação óssea).

A estimativa para o Brasil, no ano de 2018, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 170 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. Nas mulheres, o câncer de mama (29,5%), cólon e reto (9,4%), colo do útero (8,1%), traqueia, brônquio e pulmão (5,3%) e glândula tireoide (4,0%) figurarão entre os principais, conforme mostra a Tabela 1 (INCA, 2017).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 para o sexo feminino, exceto pele não melanoma.

Localização primária	Casos novos*	Porcentagem (%)
Mama feminina	59.700	29,5%
Cólon e reto	18.980	9,4%
Colo do útero	16.370	8,1%
Traqueia, brônquio e pulmão	12.530	6,2%
Glândula tireoide	8.040	4,0%
Estômago	7.750	3,8%
Corpo do útero	6.600	3,3%
Ovário	6.150	3,0%
Sistema nervoso central	5.510	2,7%
Leucemias	4.860	2,4%

*Os números foram arredondados para múltiplos de 10

Fonte: INCA, 2017.

1.2. Câncer de Mama

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres (principalmente entre 40 e 69 anos), respondendo por 21% dos casos novos a cada ano. Se diagnosticado e tratado oportunamente, o prognóstico é relativamente bom. A taxa de mortalidade relacionada ao câncer corresponde a 15%, e seus índices se apresentam crescentes e elevados, muito provavelmente porque a doença é frequentemente diagnosticada em estágios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (MOURA *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2017) a estimativa de novos casos de câncer de mama, no Brasil, para 2018 é de 59.700 com uma taxa bruta de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres, sendo relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta faixa etária sua incidência cresce progressivamente, especialmente após os 50 anos; e as estatísticas indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento.

O câncer de mama se desenvolve a partir de alterações genético-moleculares nas células do tecido mamário não sendo considerado como uma única doença, dado ao seu alto padrão de heterogeneidade clínica e molecular (MARINO, 2013). Essa heterogeneidade apresenta diferentes sinais genéticos e assim, diferentes respostas terapêuticas. O sintoma mais comum de câncer de mama é o aparecimento de nódulo (caroço), fixo, geralmente indolor, duro e irregular, mas há tumores que são de consistência branda, globosos e bem definidos. O nódulo é a principal manifestação da doença, estando presente em cerca de 90% dos casos quando o câncer é percebido pela própria mulher. Outros sinais de câncer de mama são pele de mama avermelhada, retraída ou parecida com casca de laranja; alterações (inversão) no bico do peito (mamilo); pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço; saída de líquido anormal das mamas (especialmente quando é unilateral e espontânea). Esses sinais e sintomas devem sempre ser investigados, pois podem estar relacionados a doenças benignas da mama (INCA, 2018a).

De modo geral, o carcinoma mamário pode ser dividido em carcinoma *in situ* e carcinoma infiltrativo ou invasivo. O carcinoma *in situ* ainda é dividido em ductal e lobular, dependendo dos padrões de crescimento e características citológicas, sendo o tipo ductal predominante (MARINO, 2013). Baseando-se na arquitetura do tumor, o

carcinoma ductal ainda pode ser subdividido em cinco classes reconhecidas: comedocarcinoma, cribriforme, micropapilar, papilar e sólido. De maneira semelhante aos carcinomas *in situ*, o tipo invasivo abrange um grupo heterogêneo de tumores, sendo os tipos mais frequentes: ductal invasivo (70-80% de todas as lesões) e lobular invasivo (10-15% de todas as lesões) (LI *et al.*, 2005).

O carcinoma mamário inicia-se primeiramente na unidade ductal-lobular da mama, onde se originam células unicelulares alteradas, desconhecidas que não são identificadas pela defesa natural do organismo (FEBRASGO, 2010).

A maioria dos cânceres de mama começa nas células que revestem os ductos (câncer ductal) e em células que revestem os lóbulos (câncer lobular), enquanto um número pequeno de tumores inicia-se em outros tecidos. A mama ou glândula mamária feminina é um órgão que se situa na parede anterior do tórax, na parte superior e está apoiada sobre o músculo peitoral maior. A mama feminina normal é composta principalmente de lóbulos (glândulas produtoras de leite), ductos (minúsculos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo) e estroma (tecido adiposo e conjuntivo que envolve os dutos e lóbulos, os vasos sanguíneos e linfáticos) (ROCHA, 2017).

A melhor forma de prevenção primária do câncer de mama é a amamentação e a adoção de um estilo de vida saudável, incluindo a prática regular de atividade física, a manutenção de peso corporal adequado e o consumo moderado ou ausente de álcool. A lactação, bem como a prática de atividade física são fatores protetores para o câncer de mama, tanto na pré-menopausa quanto na pós-menopausa (INUMARU *et al.*, 2011).

Os fatores reprodutivos relacionam-se com risco de câncer da mama, uma vez que os hormônios ovarianos têm um papel na iniciação do desenvolvimento mamário. Para além deste fato, o ciclo menstrual também regula a proliferação mamária. A menarca representa o início de todo este processo maturativo. A idade precoce da menarca (idade da primeira menstruação menor que 12 anos) tem sido associada ao aumento do risco de câncer da mama e esta relação observa-se tanto na pré-menopausa como na pós-menopausa (KELSEY *et al.*, 1993; INCA, 2018b).

Não existe nenhum método isento de falhas como prevenção primária para o câncer de mama; porém, existem três estratégias de prevenção secundária para a detecção precoce: o autoexame das mamas, o exame clínico das mamas e a mamografia

bilateral, sendo esta última considerada o método de eleição de rastreio em programas populacionais pelo seu impacto sobre a mortalidade (BRITO *et al.*, 2010).

O câncer de mama não tem uma causa única. Diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença, tais como: idade, fatores endócrinos/história reprodutiva, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos/hereditários (INCA, 2018b).

A nuliparidade apresenta risco aumentado de câncer da mama, sendo um fator mais relevante após os 40 a 45 anos. A idade precoce de uma gestação e a amamentação estão associadas a um menor risco de câncer da mama (KELSEY *et al.*, 1993; INCA, 2018b). A primeira gravidez abaixo dos 25 anos reduz o risco de câncer da mama em 36% (LORD *et al.*, 2008). Segundo Cipriano e Oliveira (2016), mulheres vem engravidando cada vez mais tarde, com isso sofrem mais a ação hormonal que é um dos fatores de risco para o câncer de mama.

A menopausa em idade precoce também se associa a menor risco de câncer da mama, conforme constatado em ooforectomizadas. Estima-se que este risco aumente 3% por cada ano de atraso na menopausa (CALLE *et al.*, 1996).

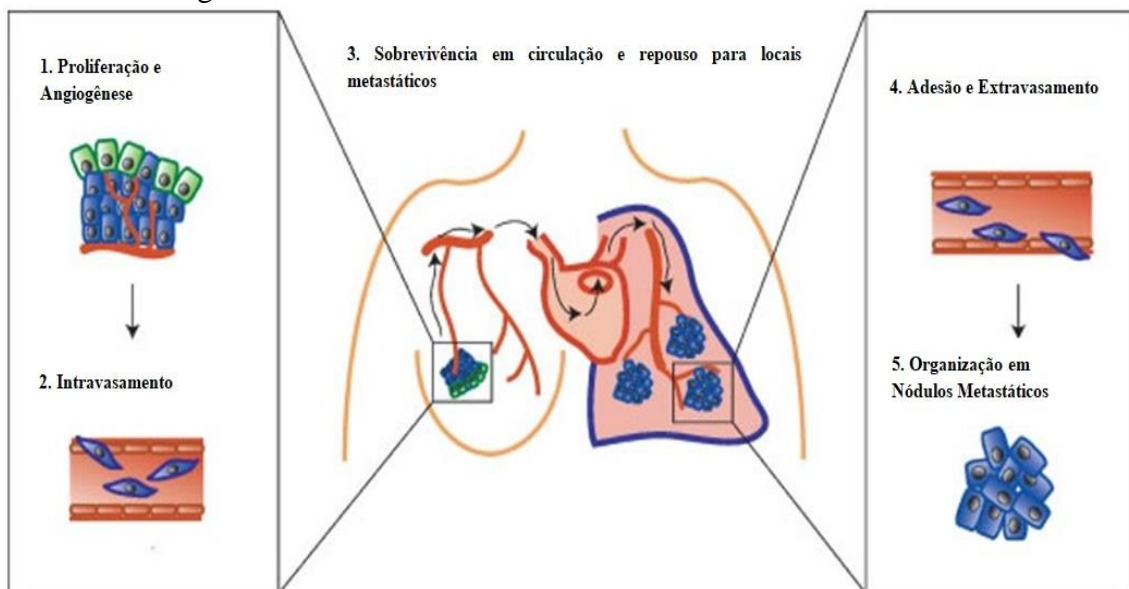
O diagnóstico do câncer de mama em estágio inicial possibilita um tratamento mais efetivo e menos agressivo. Entretanto, no Brasil, a maioria dos casos é diagnosticada em estágios avançados, correspondendo a cerca de 60% dos diagnósticos. Em tais condições, observa-se uma diminuição das chances de sobrevivência, comprometimento dos resultados do tratamento e, conseqüentemente, perdas na qualidade de vida das mulheres (FONSECA *et al.*, 2017).

A importância do diagnóstico precoce do câncer consiste em evitar o processo de metástases e, conseqüentemente, contribuir para melhor prognóstico. Neste sentido, os exames frequentemente propostos visam a analisar os locais mais acometidos por metástase à distância no câncer primário da mama, sendo em 51% dos casos o osso, seguido de 17% para o pulmão, 16% para o cérebro e 6% para o fígado (FERREIRA *et al.*, 2002). A metastização óssea tem um prognóstico mais favorável em termos de sobrevivência que a metastização visceral (SOLOMAYER *et al.*, 2000; HESS *et al.*, 2003). A metastização cerebral representa 15% das doentes com câncer da mama

metastático e é reportada uma sobrevivência média de 16 meses (WRONSKI *et al.*, 1997).

O câncer da mama metastiza para diversos órgãos, constituindo o microambiente de cada órgão sede de metastização um fator atrativo para o surgimento de metástases. No entanto, ainda não estão esclarecidos, do ponto de vista molecular quais os fatores determinantes e específicos de cada localização (ECCLES *et al.*, 2007). Por outro lado, a célula tumoral pode possuir mutações precoces que levem inevitavelmente à metastização ou, este processo, pode ser desencadeado por fenômenos de seleção natural no processo de progressão tumoral (MERLO *et al.*, 2006; HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Figura 1. Progressão metastática do câncer. A progressão do epitélio normal para o carcinoma invasivo e o estabelecimento de nódulos metastáticos em órgãos secundários requer várias etapas. (1) A proliferação descontrolada de células cancerígenas é perpetuada por mutações no epitélio normal e os nutrientes fornecidos por angiogênese. (2) A angiogênese também fornece às células cancerosas um caminho para o sistema circulatório sistêmico do corpo, resultando na mobilidade de células cancerosas em todo o corpo. (3) Após o intravasamento, as células cancerosas devem sobreviver às forças de cisalhamento da circulação e localizar o(s) local(s) metastático(s) propício. (4) Ao atingir o local metastático, as células cancerosas aderem às células endoteliais e negociam o caminho através da membrana basal e passam por extravasamento. (5) A invasão de tecidos secundários é seguida de reorganização das células cancerígenas em nódulos tumorigênicos.



Fonte: TSE e KALLURI, 2007.

A metastização é um processo em cascata que envolve várias etapas sequenciais (Figura 1), múltiplos fatores e interações do hospedeiro. A disseminação do câncer da mama envolve uma série de processos, desde um estágio inicial *in situ*, progredindo para lesão invasiva e podendo assim adquirir potencial de metastização (CARVALHO, 2010).

O processo de metastização resulta da ativação de várias moléculas, como matrix metaloproteinases (MPPs), oncogenes e moléculas de adesão celular. Sendo a metastização um conjunto de acontecimentos sequenciais, o bloqueio de um simples passo na cascata pode prevenir a metastização (FIDLER e RADINSKY, 1996).

Os receptores tirosina quinase medeiam grande parte do processo de metastização, bem como a promoção da proliferação e são considerados alvos terapêuticos (SHAWVER *et al.*, 2002; SLAMON *et al.*, 2001).

A identificação de fatores relacionados ao desenvolvimento de metástase óssea poderia contribuir para a detecção e início da terapia mais oportunos, trazendo maiores benefícios advindos do tratamento a essas pacientes (BRUM *et al.*, 2017).

A biópsia é a única maneira de confirmar que o câncer está realmente presente, sendo realizada quando as mamografias, outros exames de imagem, ou o exame físico identificam uma anormalidade na mama (WILLETT *et al.*, 2010). É uma amostra da área suspeita, sendo esta removida para ser observada sob o microscópio, por um médico especializado, com anos de treinamento, um patologista. Existem vários tipos de biópsias, como a punção aspirativa por agulha fina (PAAF); núcleo (grande agulha), biópsia cirúrgica e biópsia a vácuo-assistida. Cada uma possui seus prós e contras e a escolha de qual realizar depende da situação específica de cada paciente e deve incluir local, tamanho e lesões da neoplasia suspeita, problemas médicos e preferências pessoais (ROCHA, 2017).

A biópsia é realizada apenas se houver uma área anormal encontrada em exame físico e de imagem. Quando o método de diagnóstico triplo multidisciplinar (avaliação clínica, avaliação por imagem e biópsia de agulha) der o mesmo resultado, normalmente, é possível fornecer um diagnóstico definitivo (GIOVAGNOLI *et al.*, 2015; WILLETT *et al.*, 2010).

O primeiro contato com o diagnóstico gera angústia e medo tanto nas mulheres quanto nos familiares. Nesta fase os sentimentos variam de acordo com a personalidade de cada mulher, mas geralmente esta fase é acompanhada de sentimento de frustração, estresse, revolta, ansiedade, negação e depressão. Outras agem de maneira indiferente a doença, mas na maioria dos casos as mulheres buscam na fé o fortalecimento para o enfrentamento da doença (GONTIJO e FERREIRA, 2014).

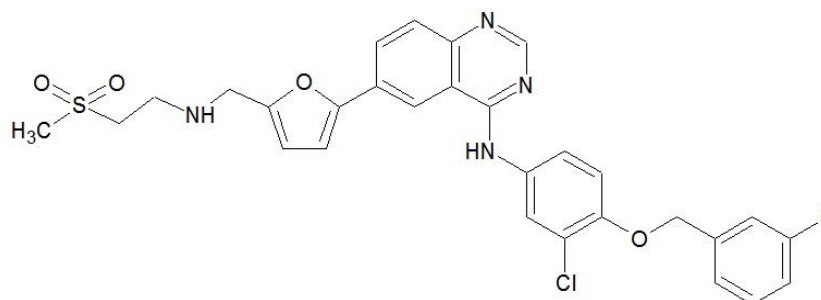
Tanto a mastectomia como a quimioterapia alteram a imagem corporal, fazendo com que isso se reflita de forma negativa na aceitação do seu "novo corpo". A mastectomia causa alteração na auto-estima e a quimioterapia potencializa essa alteração, já que ocasiona efeitos colaterais que afetam a mulher física e psicologicamente (BERVIAN e GIRARDON-PERLINI, 2006).

No câncer de mama, além das preocupações citadas acima, encontram-se presentes outras angústias ligadas à feminilidade, maternidade e sexualidade, já que o seio é um órgão repleto de simbolismo para a mulher. Sendo assim, o anúncio desse diagnóstico, seguido pelos tratamentos, pode ocasionar abalos significativos na vida da paciente (VENÂNCIO, 2004).

1.3. Lapatinibe

Lapatinibe é uma molécula (Figura 2) que bloqueia o domínio intracelular de dois receptores tirosina-quinase da família de EGFR, o HER1 e o HER2 (GOMEZ *et al.*, 2005 e GEYER *et al.*, 2006). Ele liga-se ao trifosfato de adenosina (ATP), sendo o local de ligação de tirosina-quinase intracelular, o que levaria à inibição da proliferação de células induzida pela superexpressão em células de câncer (BURSTEIN *et al.*, 2001; GOMEZ *et al.*, 2005; MOY e GOSS, 2006; XIA *et al.*, 2004). O Lapatinibe inibe também uma forma de receptor HER2, conhecida por p95HER2 ou HER2 truncado, cujo domínio extracelular de ligação ao trastuzumabe está ausente, o que confere resistência ao uso deste fármaco (SCALTRITI *et al.*, 2007).

Figura 2. Estrutura química do lapatinibe.



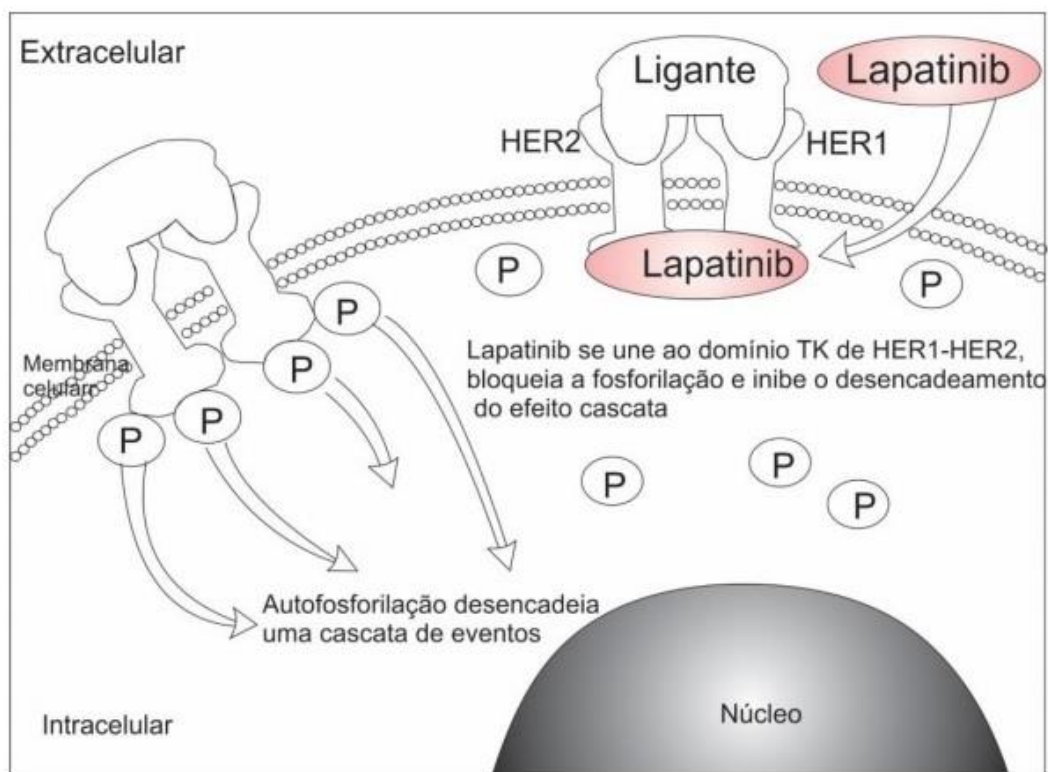
Fonte: Autoria própria.

O lapatinibe pertence a uma classe de fármacos para tratamento do câncer denominada terapia alvo dirigida, destinada a intervir em diversos processos celulares ou mecanismos da doença, encontrados no câncer (DEMOLINER e CORTE, 2010). Dois aspectos importantes das suas propriedades farmacológicas são o seu mecanismo de ação intracelular e a sua administração via oral. O lapatinibe inibe drasticamente o crescimento tumoral em células com câncer de mama com superexpressão de receptores ErbB1 ou ErbB2 (GEYER *et al.*, 2006). Outra propriedade do lapatinibe descrita na literatura é a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica o que o tornaria útil no tratamento de metástases cerebrais (PAL e PEGRAM, 2007).

O lapatinibe é metabolizado principalmente pela enzima CYP3A4 no fígado. Assim sendo, os inibidores e os indutores dessa enzima podem alterar a farmacocinética do lapatinibe. A administração concomitante de lapatinibe com inibidores de CYP3A4 conhecidos deve ser conduzida com cautela, e a resposta clínica e os eventos adversos devem ser cuidadosamente monitorados. A solubilidade do lapatinibe é dependente do pH (DEMOLINER e CORTE, 2010).

O mecanismo (Figura 3) pelo qual o lapatinibe atua é pela inibição de forma reversível a auto fosforilação dos receptores tirosina quinase. Isso impede que ocorra uma cascata de reações que favorece a transcrição de genes, sobrevivência e proliferação celular (PAUL *et al.*, 2008).

Figura 3. Mecanismo de ação do lapatinibe. A família do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER) é composta por tirosina cinases transmembranares (TKs). A ligação de ligantes ao domínio extracelular de HERs conduz à formação de homodímeros (constituídos por HERs idênticos) ou heterodímeros (constituídos por diferentes HER). A ligação do ligante e a dimerização ativam a ligação do trifosfato de adenosina ao domínio TK intracelular. A autofosforilação desencadeia uma cascata de reações relacionadas à progressão do ciclo celular, transcrição de genes, sobrevivência de células tumorais, proliferação celular e organização do citoesqueleto. Lapatinib liga-se ao domínio TK do heterodímero HER1-HER2 e bloqueia a autofosforilação e a cascata de reações a jusante. P = fosfato.



Fonte: CEOLIN, 2016 adaptado de PAUL *et al.*, 2008.

Dada a capacidade de ligação aos receptores desprovidos de domínio extracelular, o lapatinibe foi aplicado aos casos resistentes ao trastuzumab (SCALTRITI *et al.*, 2007). Os estudos evidenciam que ocorre desenvolvimento de resistência adquirida ao trastuzumab devido à degradação do receptor HER2, como o lapatinibe induz estabilização do receptor, resensibiliza as células neoplásicas HER2 positivo para a ação posterior do trastuzumab (GORI *et al.*, 2012).

Os estudos clínicos que se sucederam vieram mostrar que o benefício do lapatinibe era limitado aos pacientes que são ErbB-2 positivos com câncer da mama

metastizado. Este fármaco em monoterapia mostrou resultados favoráveis na taxa de recidiva e nos casos refratários de carcinoma inflamatório da mama ErbB-2 positivos, com uma taxa de resposta de 62% (NORMANNO *et al.*, 2009). A utilidade do lapatinibe numa fase mais precoce da história natural do câncer da mama não foi ainda definida. Estão em curso alguns estudos como ALTTO e Neo-ALTTO (Neo-Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimisation) que estão a avaliar a eficácia do lapatinibe isolado em comparação com trastuzumab como tratamento adjuvante e neoadjuvante (CARVALHO, 2010). O tratamento adjuvante consiste de quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia (BEZERRA *et al.*, 2013).

A segurança de lapatinibe deve ser avaliada, uma vez que está associada a efeitos cardíacos adversos (PEREZ *et al.*, 2008), diarreia, vômitos, náuseas, fadiga, erupção cutânea e prurido (coceira) (GEYER *et al.*, 2006; GOMES, 2013).

Nos últimos anos, a análise do status do HER2 se tornou ainda mais importante após aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) de tratamentos alvo-específicos: trastuzumab (HerceptinTM), lapatinib (TykerbTM), pertuzumab (PerjetaTM). Mais recentemente, foi aprovado pelo FDA o quarto fármaco contra o HER2, trastuzumab-maytansine (KadcylaTM), também conhecida como T-DM1 (MILES, 2001; ROSS *et al.*, 2007; SHAH e CHEN, 2011; SLAMON *et al.*, 1987; WOLFF *et al.*, 2013).

1.4. Sistema de Liberação de Fármacos e PLGA

No sistema de liberação controlada, o princípio ativo é encapsulado em uma matriz que deve apresentar as seguintes características: permitir a modelagem para a forma desejada e a liberação da substância ativa, ter estabilidade adequada e ser atóxica (PANYAM e LABHASETWAR, 2003).

Uma das aplicações mais promissoras das nanopartículas é seu uso para o transporte de fármacos pela barreira hematoencefálica. Essa barreira representa um difícil obstáculo para um grande número de fármacos, incluindo medicamentos anticancerígenos, antibióticos e uma variedade de medicamentos ativos do sistema nervoso central, especialmente neuropeptídeos (KREUTER, 2007). Nanopartículas podem ser usadas como transportadoras de fármacos para quimioterápicos entregando a

medicação diretamente às células tumorais e poupando o tecido saudável (BERRY e CURTIS, 2003).

A tecnologia de nanopartículas se mostrou viável na escala comercial quando o primeiro produto que usava nanopartículas, Abraxane[®], uma suspensão injetável de nanopartículas de albumina ligado com paclitaxel e utilizado para terapia contra câncer, ficou disponível em 2005 (SUNG *et al.*, 2007).

A linha divisória entre nanopartículas e micropartículas ainda é matéria de debate, com algumas fontes considerando partículas de até 1000 nm como nanopartículas, como é o caso da Comunidade Européia pelo Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), enquanto o escritório de patentes dos Estados Unidos e a IUPAC as define usando a escala 1-100 nm ou ligeiramente maior. É importante ressaltar que por uma questão de consistência com o prefixo “nano” e o intervalo imposto pela definição, as dimensões das nanopartículas devem ser expressas em nm.

O termo nanopartícula é uma expressão coletiva usada para designar tanto nanoesferas quanto nanocápsulas, as quais diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, permitindo que o fármaco esteja dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica compacta, na qual o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (FERREIRA, 2012).

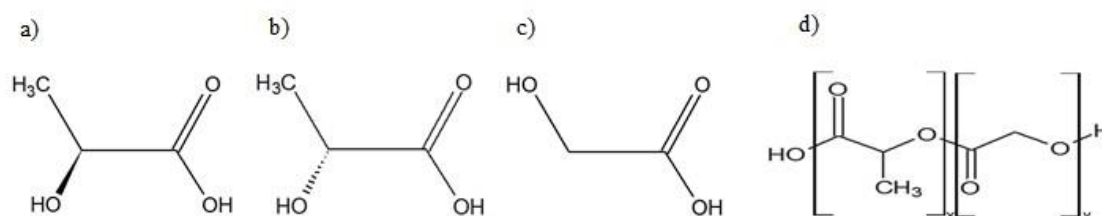
A microencapsulação é uma das técnicas capazes de modificar e controlar a liberação de fármacos (KHAN *et al.*, 2010). Dependendo dos materiais utilizados em sua obtenção, as microesferas podem liberar o fármaco em um sítio específico e ainda protegê-lo de condições adversas encontradas durante o trânsito no trato gastrointestinal (TGI), como o pH ácido do estômago ou a presença de enzimas que podem inativá-lo antes de desempenhar o efeito terapêutico (TRAN *et al.*, 2011).

Os polímeros utilizados na preparação dessas nanopartículas são moléculas orgânicas de alta massa molecular, constituídos em geral, por mais de 50 monômeros. Ao se agregarem em um padrão regular, formam uma matriz ou reservatório onde o fármaco estará inserido. A liberação do fármaco é facilitada pela dissolução gradual da

matriz e é controlada pela solubilidade e porosidade da mesma (HILLERY *et al.*, 2001). Os polímeros mais usados para síntese de nanopartículas podem ser naturais, como a quitosana e o alginato, ou sintéticos, como o ácido poli lático (Hines e Kaplan), ácido poli glicólico (PGA) e o co-polímero ácido poli lático-glicólico (PLGA). Esses polímeros são conhecidos por sua biocompatibilidade e sua reabsorção pelas vias naturais (HANS e LOWMAN, 2002; COMMANDEUR *et al.*, 2006).

Entre os sistemas carreadores destaca-se o uso de polímeros biodegradáveis sintéticos, como o poli(lático-e-ácido glicólico) - PLGA, um copolímero, largamente utilizado na indústria farmacêutica e médica. Como o nome sugere, sua síntese ocorre pela copolimerização randômica de anéis abertos de dois diferentes monômeros, os dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-diona) do ácido glicólico e do ácido lático (Figura 4). Durante o processo de copolimerização os monômeros destes dois ácidos são ligados por ligações de éster, formando uma cadeia linear de poliéster alifático como produto final (ASTETE e SABLIOV, 2006).

Figura 4. Estruturas moleculares de a) L-PLA - ácido lático levógeno; b) D-PLA - ácido lático dextrógeno; c) PGA - ácido glicólico e d) PLGA - Poli (lático-e-ácido glicólico), sendo que x= número de unidades de ácido lático e y= número de unidades de ácido glicólico.



Fonte: Autoria própria.

PLGA é um poliéster relativamente hidrofóbico, instável em condições úmidas e biodegradável a subprodutos atóxicos (ácido lático, ácido glicólico, dióxido de carbono e água). Os polímeros derivados dos ácidos lático e glicólico têm recebido muita atenção nas pesquisas de polímeros biodegradáveis alternativos, existindo diversos estudos demonstrando sua baixa toxicidade, inclusive com aprovação pelo Food and Drug Administration (FDA) para a utilização como sistemas de liberação de fármacos (SOARES *et al.*, 2005; STEVANOVIC *et al.*, 2009; STEVANOVIC e USKOKOVIC, 2009).

O ácido poli-láctico-e-glicólico (PLGA) é o polímero mais conhecido e amplamente aplicado em sistemas de liberação controlada. Este polímero sintético encontrou grande sucesso devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e cinética de liberação favorável, mas também enfrenta preocupações de estabilidade quanto à administração de proteínas (CROTTS e PARK, 1998).

1.5. Funcionalização de nanopartículas

Segundo Horie (HORIE *et al.*, 2004), a União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC define polímeros funcionais como:

- a) Um polímero que possui grupos funcionais (tais como grupos hidroxila, carboxila ou amino) que tornam o polímero reativo, ou;
- b) Um polímero que desempenha uma função específica para a qual é produzido e utilizado. A função no último caso pode ser uma função química, como uma reatividade específica ou uma função física como a condutividade elétrica. Os polímeros que contêm grupos funcionais reativos geralmente são considerados polímeros capazes de sofrer reações químicas.

Exemplos de funções de polímeros funcionais de acordo com a definição (b) são atividade catalítica, ligação seletiva de espécies particulares, captura e transporte de transportadores de carga elétrica ou energia, conversão de transportadores de luz para carga e vice-versa e transporte de fármacos para um determinado órgão em que o fármaco é liberado (HORIE *et al.*, 2004).

A funcionalização de um polímero é a introdução de grupos químicos desejados para criar uma estrutura específica com propriedades físicas, biológicas e farmacológicas diferenciadas (PICHOT, 2004). A inserção dos grupos funcionais nos polímeros pode ocorrer durante a polimerização, com o uso de monômeros específicos, ou por meio de posterior modificação química no polímero (TIAN *et al.*, 2012). A presença destes grupos funcionais possibilita o direcionamento das partículas para sítios alvo, favorecendo o tratamento de doenças (CAMPOS *et al.*, 2016).

Segundo TIAN *et al.* (2012), a funcionalização dos polímeros é muito desejável em aplicações de liberação controlada, favorecendo o melhoramento das propriedades dos polímeros tradicionais.

As nanopartículas poliméricas apresentam um grande potencial como agente transportador de fármaco, pois a sua superfície pode ser modificada quimicamente, possibilitando a incorporação de agentes terapêuticos, de agentes de imageamento por ressonância magnética, de ligantes (anticorpos) que reconheçam de forma específica as células do câncer (FARAJI e WIPF, 2009; FRECHET, 2002).

Os sistemas revestidos de distribuição de partículas PLGA continuam a ser investigados e seu sucesso oferece oportunidades para novos sistemas de entrega direcionados que também podem manter a liberação controlada ou sustentada (GALESKA *et al.*, 2005).

As nanopartículas poliméricas são altamente versáteis, pois suas propriedades físico-químicas podem ser controladas de acordo com sua composição e com os seus grupos funcionais terminais. Nanopartículas com um núcleo hidrofóbico podem ser utilizadas para o encapsulamento de fármaco anticâncer hidrofóbicos, enquanto a camada hidrofílica permite a solubilidade e estabilidade no sangue, permitindo a entrega do fármaco no local do tumor explorando o efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (LEE *et al.*, 2009).

1.6. A interação entre nanopartículas e proteínas

De forma geral, diz-se que as proteínas são capazes de adsorver sobre a maioria das superfícies, visto seu caráter complexo no que diz respeito às cargas e estrutura (PEIXOTO, 2013). A camada de adsorção de proteína que se forma na superfície das nanopartículas é chamada “proteína corona” (DEL PINO *et al.*, 2014).

O processo de adsorção de proteínas nas interfaces sólido-líquido é realizado em três etapas (SILVA, 2017):

- 1) transporte da proteína até a superfície;
- 2) ligação da proteína à superfície (interface sólido-líquido);

3) acomodação conformacional da proteína na interface sólido-líquido.

Em geral, a interação entre as nanopartículas e proteínas são classificadas em três tipos (SILVA, 2017):

1) Interações coulômbicas, que ocorrem por atração eletrostática entre os ligantes ionizados na superfície da nanopartícula e os resíduos de aminoácidos carregados da proteína, tais como a lisina e a histidina.

2) A interação por ligação de hidrogênio é caracterizada pela atração eletrostática entre os dipolos formados por átomos de hidrogênio e átomos fortemente eletronegativos (flúor, oxigênio e nitrogênio), presente na estrutura da proteína ou na superfície da nanopartícula. As proteínas têm muitos grupos que contêm átomos de hidrogênio e átomos eletronegativos, capazes de formar um grande número de ligações de hidrogênio com ligantes associados às nanopartículas.

3) As interações hidrofóbicas resultam da atração entre as cadeias de aminoácidos hidrofóbicos da proteína e ligantes hidrofóbicos presentes na superfície das nanopartículas.

Estudos recentes exploram novas formas de utilizar a nanopartícula ligada à proteína corona, nos quais foram demonstrados que novos alvos terapêuticos para o câncer podem ser identificados pelo complexo nanopartícula-proteína corona (LIU e PENG, 2017).

A formação da proteína corona é um processo biológico complexo, contingente e dinâmico que depende de vários elementos, ou seja, tipo de molécula de proteína, tamanho e sua flexibilidade conformacional; tipo de nanopartículas, tamanho, forma, carga elétrica e hidrofobicidade, dentre outros fatores (LIU e PENG, 2017).

A maioria dos métodos propostos na literatura, para imobilização de biomacromoléculas, parte de uma superfície considerada ativada para acoplamento; ou seja, admite-se que a superfície do material possui grupos químicos reativos como hidroxilas (-OH), aminas (-NH₂) e ácidos carboxílicos (-COOH) (PEIXOTO, 2013).

A proteína corona é a identidade biológica de uma nanopartícula, com quem a célula "vê" e interage, sendo que os impactos biológicos das nanopartículas são afetados

pela natureza da camada proteica adsorvida, ou a proteína (biomolécula) corona (LYNCH e DAWSON, 2008).

A corona se forma devido à alta energia livre da superfície das nanopartículas, resultando em absorção de várias moléculas, principalmente proteínas. Quando as proteínas se ligam as nanopartículas, elas podem sofrer mudanças conformacionais que podem ser reversíveis ou irreversíveis (WOLFRAM *et al.*, 2014). Essas mudanças podem ocorrer devido à grande área de interação (PEIXOTO, 2013).

A interação entre aminoácido e nanopartículas não só influenciará as propriedades básicas da nanopartícula, mas também induzirá os rearranjos estruturais do aminoácido como "mudanças conformacionais". Para a molécula de proteína individual, as forças secundárias, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, interação eletrostática e ligação de hidrogênio desempenham papéis importantes na manutenção e estabilização de sua estrutura e conformação (LIU E PENG, 2017).

Entende-se que a interação hidrofóbica é de grande importância nos fenômenos de adsorção de proteínas em uma superfície fracamente modificada. A quantidade de proteína adsorvida por esta interação é máxima na vizinhança do ponto isoelétrico da proteína e o pH na adsorção máxima muda para uma região mais ácida, com aumento de força iônica. A adsorção de proteínas é maior em uma superfície hidrofóbica do que em uma hidrofila, se houver apenas interação hidrofóbica (KIM e YOON, 2002).

Em geral, as nanopartículas tornam-se maior como resultado das interações proteicas. Este aumento de tamanho geralmente está na faixa de 20-70 nm, sugerindo que a corona consista em múltiplas camadas de proteínas. Contudo, os parâmetros que ditaram o número de camadas que cercam uma nanopartícula permanecem evasivos (WOLFRAM *et al.*, 2014). Acredita-se que as propriedades particulares das superfícies, juntamente com as propriedades específicas das proteínas, determinam a organização das camadas de proteína adsorvida (NOGUEIRA, 1999).

Um estudo inicial no campo das interações proteicas com superfícies planas chamou a atenção para o fato de que a distorção da proteína pode ocorrer após a adsorção (LYNCH e DAWSON, 2008). Segundo Barros (2018), nos últimos anos foi estudada a adsorção imediata das proteínas presentes em meios biológicos as quais formaram uma coroa de proteínas na superfície dos nanomateriais e também surgiram

investigações de grande importância sobre as mudanças de conformação das proteínas quando adsorvidas na superfície dos nanomateriais e o impacto que essas alterações podem causar na estabilidade e funções desses materiais.

Segundo Kim e Yoon (2002), se o mecanismo exato de adsorção de proteínas em partículas poliméricas fosse bem conhecido, então as ligações de hidrogênio, as ligações iônicas e as interações hidrofóbicas poderiam ser exploradas para funcionalização, o que poderia promover uma enorme redução de tempo e esforço requeridos para imobilizar proteínas por meio de ligações covalentes produzidas com auxílio de reações complicadas. Segundo Nogueira (NOGUEIRA, 1999), as propriedades do meio, tais como pH, temperatura e força iônica são determinantes na adsorção.

A proteína corona pode desencadear a agregação de nanopartículas por meio de pontes de proteína, resultando em formação de agrupamentos maiores. Por outro lado, a presença de uma proteína corona pode também estabilizar as partículas e impedir a agregação. Além disso, como a maioria das proteínas é carregada negativamente, a formação de uma proteína corona na superfície das nanopartículas se torna aniônica (WOLFRAM *et al.*, 2014).

1.7. Leucina

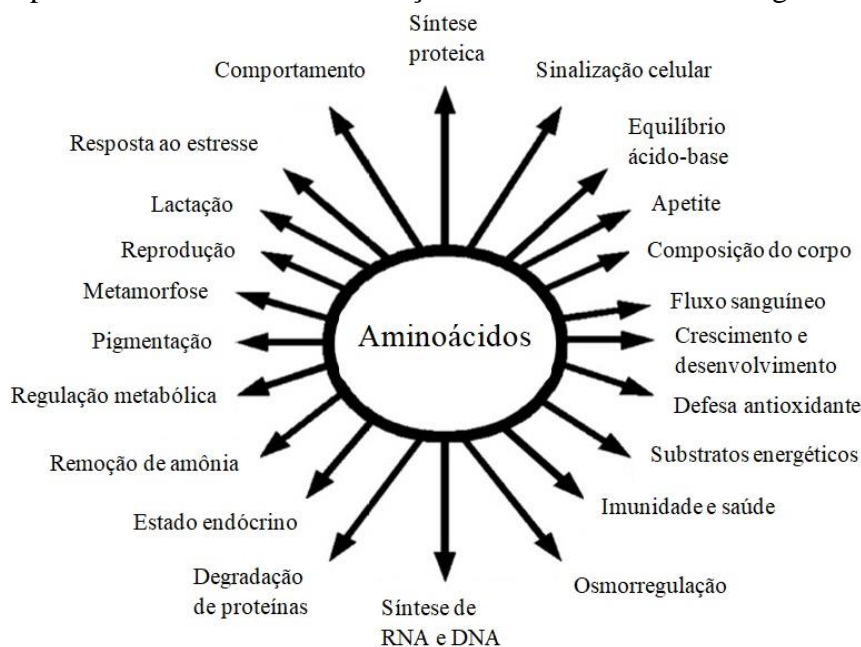
As proteínas são macromoléculas formadas por unidades menores, ou unidades fundamentais, os aminoácidos, unidos por meio de ligações peptídicas. Existem 20 aminoácidos que se combinam de diferentes formas para compor as proteínas do corpo humano. Estes aminoácidos diferem em sua estrutura química, e podem ser divididos em sulfurados, aromáticos, básicos, ácidos e aminoácidos de cadeia ramificada (WATANABE, 2017).

Em humanos saudáveis, nove aminoácidos são considerados essenciais uma vez que devem ser consumidos por meio da dieta por não serem sintetizados endogenamente. Dentre esses aminoácidos, incluem os três aminoácidos de cadeia ramificada, ou seja, a leucina, isoleucina e valina que representam 35% de aminoácidos essenciais em proteínas musculares (ROGERO e TIRAPEGUI, 2008). A suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada é também conhecida como ACR (Aminoácidos de

Cadeia Ramificada) ou BCAA (do inglês *Branched-Chain Amino Acids*) (MERO, 1999).

Constituídas por cadeias de aminoácidos, além de servirem de substrato energético para o crescimento e desenvolvimento do organismo, as proteínas também desempenham funções diversas como a regulação do metabolismo, transporte de nutrientes, catalisadores naturais, defesa imunológica, receptores de membranas, dentre outras (Figura 5). Quando não usadas imediatamente pelo organismo para a síntese de outras proteínas ou tecidos, são importantes no fornecimento de energia para outras funções orgânicas (FRUEHWIRTH *et al.*, 2015).

Figura 5. Papéis dos aminoácidos na nutrição e homeostase de todo organismo.

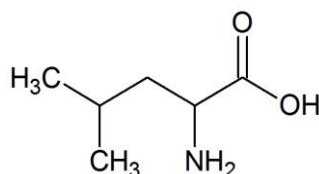


Fonte: traduzido de WU, 2010.

Historicamente, a leucina sempre se destacou sendo mais importante do que os outros dois aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina e valina) (HUTSON e HARRIS, 2001). Segundo Mero (1999) e Shimomura e Harris (2006), a leucina se destaca porque sua taxa de oxidação é maior, liberando precursores como alanina a partir do músculo esquelético, estimulando a síntese proteica em maior quantidade que os demais aminoácidos.

A suplementação de leucina, ácido 2-aminoisocaproico ou ácido 2-amino-4-metil-pentanoico (Figura 6), aminoácido com cadeia lateral alifática e hidrofóbica (apolar), parece ser uma promissora terapia antiatrófica, agindo tanto pela inibição da proteólise do músculo esquelético como também pelo aumento na síntese proteica (ZANCHI *et al.*, 2009).

Figura 6. Estrutura química da leucina.



Fonte: Autoria própria.

A leucina tem sido investigada por ser estimuladora da síntese de proteínas no músculo e está intimamente associada com a liberação de precursores gliconeogênicos (Mero, 1999). Ela é citada por diversos autores como sendo uma estratégia terapêutica capaz de evitar a atrofia muscular em diversas situações, como doenças musculares, sepse e câncer (NICASTRO *et al.*, 2011).

A caquexia é definida como uma síndrome multifatorial que leva à perda acentuada de peso corporal, de forma involuntária e irreversível (FAVERO, 2017). A caquexia está intimamente relacionada ao câncer, acometendo cerca de metade dos pacientes, dependendo do tipo de tumor, sendo responsável por um terço das mortes causadas por esta patologia (FEARON *et al.*, 2011; VON HAEHLING e ANKER, 2010). Essa síndrome é diagnosticada quando há perda a partir de 5% da massa magra, em menos de seis meses, quando, por exemplo, na presença de patologia como o câncer (ARGILES *et al.*, 2016).

A taxa média de sobrevivência e a resposta à quimioterapia são menores em pacientes com intensa perda de peso associada ao câncer. Assim, o insucesso do tratamento clínico do paciente com câncer-caquexia torna-se ainda mais evidente, pois além da severa perda de peso, vários sintomas como anorexia, saciedade prematura, anemia, edema e astenia (perda ou diminuição da força física) estão associados (FAVERO, 2017).

Para prevenir a perda de massa magra ou mesmo mantê-la, é indicada quantidade suficiente de proteínas na dieta, já que, para que haja síntese, é necessário que sejam providos aminoácidos essenciais como substrato (MILNE *et al.*, 2009).

No estado câncer-caquexia, o aumento do consumo alimentar não é capaz de reverter às alterações metabólicas observadas nos pacientes, porém, estudos têm mostrado análises específicas para uso de terapias coadjuvantes no sentido de minimizar os efeitos do estado caquético (FEARON, 2008; VERHOEVEN *et al.*, 2009; CASPERSON *et al.*, 2012). O grau da caquexia é inversamente correlacionado com o tempo de sobrevivência do paciente e sempre implica em mau prognóstico e deterioração da qualidade de vida (DA SILVA, 2006).

Pacientes que apresentam câncer-caquexia demonstram anormalidades no metabolismo proteico muscular esquelético, com conseqüente atrofia muscular, em função do desequilíbrio do *turnover* proteico corpóreo, reduzindo a síntese proteica e aumentando a degradação proteica (VENTRUCCI, 2005).

Segundo ZANCHI *et al.* (2008), a leucina é considerada atualmente não apenas um aminoácido constituinte de uma proteína, mas também uma substância físico-farmacológica, sendo que sua administração é capaz de promover efeitos anticatabólicos importantes, assim como uma atenuação do catabolismo muscular esquelético durante perda de peso, facilitação de um processo de cura ou mesmo melhora do *turnover* proteico muscular esquelético.

A leucina é importante combustível metabólico da musculatura esquelética e parece estimular a incorporação de aminoácidos nas proteínas e inibir a degradação proteica (RENNIE e TIPTON, 2000; VENTRUCCI *et al.*, 2004).

Neste trabalho as nanopartículas de PLGA contendo o quimioterápico lapatinibe foram produzidas através do método de simples emulsificação e evaporação do solvente em seguida foram funcionalizadas com a leucina através do acoplamento com EDC/NHS. E realizada a caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas produzidas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas de PLGA, contendo o quimioterápico lapatinibe, funcionalizadas com leucina, visando desenvolver um sistema de encapsulamento e direcionamento de fármaco para futura aplicação no tratamento de câncer.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Encapsular eficientemente o fármaco lapatinibe nas nanopartículas de PLGA, pelo método de simples emulsão seguida da evaporação do solvente;
- ✓ Funcionalizar as nanopartículas, contendo o fármaco, com o aminoácido leucina;
- ✓ Determinar características físico-químicas das nanoestruturas produzidas: diâmetro, potencial zeta, eficiência de encapsulamento, perfil de liberação;
- ✓ Caracterizar morfologicamente as nanopartículas produzidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

- ✓ Acetato de sódio trihidratado P.A., $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, massa molar de 136,08 g/mol, marca Grupo química[®];
- ✓ Ácido acético glacial P.A., $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, massa molar de 60,05 g/mol, dosagem mínima de 99,7%, marca J.T. Baker[®];
- ✓ Ácido poli(D,L-láctico-e-glicólico), PLGA, do inglês, *poly(DL-lactide-co-glycolic acid)*, $[\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]_x[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2]_y$, proporção 50:50, massa molar entre 40.000,0 – 75.000,0 g/mol, grau de pureza acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich[®];

- ✓ Diclorometano (Cloro de metileno) P.A., CH_2Cl_2 , massa molar de 84,93 g/mol, grau analítico de pureza, teor acima de 99,5%, marca Impex[®];
- ✓ Dimetilsulfóxido P.A., DMSO, $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$, massa molar de 78,13 g/mol, grau biológico de pureza, teor acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Lapatinib, $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{ClFN}_4\text{O}_4\text{S}$, massa molar de 581,06 g/mol, marca Sigma-Aldrich[®];
- ✓ L-Leucina, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$, massa molar de 131,17 g/mol, grau reagente 98%, marca Sigma-Aldrich[®];
- ✓ N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, EDC, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$, massa molar de 191,70 g/mol, grau de pureza superior a 98,0%, marca Sigma-Aldrich[®];
- ✓ N-hidroxisuccinimida, NHS, $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$, massa molar de 115,09 g/mol, grau de pureza superior a 97%, marca Sigma-Aldrich[®];
- ✓ Poli(álcool vinílico), PVA, do inglês, *Poly(vinyl alcohol)*, $[-\text{CH}_2\text{CHOH}-]_n$, massa molar entre 13.0000 – 23.000 g/mol, hidrolisado entre 87,0 – 89,0%, marca Sigma-Aldrich[®];

3.1.2. Equipamentos

- ✓ Agitador de tubos tipo vortex da marca IKA[®], modelo labdance;
- ✓ Agitador magnético da marca IKA[®], modelo Topolino;
- ✓ Balança analítica da marca Shimadzu[®], modelo AX200;
- ✓ Centrífuga de bancada para microtubos da marca Eppendorf[®], modelo MiniSpin;
- ✓ Dispersador de alto desempenho Ultraturrax da marca IKA[®], modelos T25, equipado com o elemento de dispersão S25N-25F;
- ✓ Dispersador de alto desempenho Ultraturrax da marca IKA[®], modelos T10, equipado com o elemento de dispersão S10N-5G;

- ✓ Espectrofotômetro de fluorescência da marca Hitachi High-Technologies Corporation[®], modelo F-7000;
- ✓ Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier da marca Shimadzu[®], modelo IRPrestige-21;
- ✓ Espectrofotômetro Ultravioleta-visível (UV-vis) da marca Hitachi High-Technologies Corporation[®], modelo U-3900H;
- ✓ Espectrofotômetro Ultravioleta-visível (UV-vis) da marca Perkin Elmer[®], modelo Lambda 25;
- ✓ Medidor de tamanho e potencial zeta da marca Malvern Instruments Limited[®], modelo Zetasizer Nano ZS;
- ✓ Micropipeta volume variável monocanal basic de 10-100 µL e 100-1.000 µL da marca Kasvi[®].

3.1.3. Soluções

- ✓ Solução estoque de álcool polivinílico

Solução estoque na concentração de 2,0% (m/v) foi preparada pela adição de 2 g de PVA em um béquer de vidro e adicionado 100 mL de água destilada. Essa solução foi aquecida em banho-maria a 95°C até total homogeneização e, depois de frio, foi transferida pra um frasco de vidro e armazenado sob refrigeração.

- ✓ Solução tampão fosfato de sódio

Para preparo de um litro de solução tampão fosfato (PBS, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) 0,1 mol/L, com pH 7,4, foram medidas as seguintes massas: 9,000 g de cloreto de sódio, 0,520 g de fosfato de sódio monobásico e 2,300 g de fosfato de sódio bibásico. Esses compostos foram solubilizados em 1,0 L de água ultrapura. Foi medido o pH da solução, sendo necessário, o mesmo foi ajustado utilizando solução de HCl 0,1 mol/L ou de NaOH 0,1 mol/L disponíveis no laboratório.

- ✓ Solução tampão acetato de sódio e ácido acético

Para o preparo dessa solução, inicialmente foi preparado 100,0 mL de solução de ácido acético 0,1 mol/L, transferindo 570,0 μ L de ácido acético glacial P.A. para um balão volumétrico de 100,0 mL e completando o volume com água ultrapura. Em seguida, foi preparada uma solução de acetato de sódio na concentração de 0,1 mol/L. Para isso, foi medido aproximadamente 0,820 g desse sal anidro P.A. sendo em seguida essa massa solubilizada com água ultrapura e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100,0 mL. Ambas as soluções foram então misturadas e a solução resultante foi transferida para um frasco com tampa. O pH da solução obtida foi medido e, quando necessário, ajustado para 4,7 com a adição das soluções de HCl 0,1 mol/L ou NaOH 0,1 mol/L disponíveis no laboratório.

3.2. Métodos

3.2.1. Produção das nanopartículas

Inicialmente foi misturado 100 mg do polímero PLGA (composto de 50% de ácido láctico e 50% de ácido glicólico) em 10 mL do solvente orgânico diclorometano (CH_2Cl_2) e 10 mg de lapatinibe. Em seguida, essa mistura foi adicionada, por gotejamento, em uma solução aquosa contendo 20 mL de tensoativo PVA 2% colocada em banho de gelo e homogeneizado com o ultra-turrax (verificando a temperatura com o termômetro). Ocorrendo então, uma emulsificação espontânea, formando um sistema turvo devido à imiscibilidade de ambas as fases. Após a emulsificação, a solução foi submetida à agitação magnética, por 4 h, para a evaporação total do solvente orgânico e precipitação das nanopartículas do polímero com o fármaco. Em seguida, as nanopartículas foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos. Após esse tempo o sobrenadante foi coletado e guardado para posterior análise. As nanopartículas precipitadas foram lavadas duas vezes com água destilada da seguinte forma: foi adicionada água destilada no eppendorf contendo as nanopartículas e colocado na centrífuga por 20 minutos a 14000 rpm, para a remoção da solução de PVA restante, em seguida a água foi descartada e o procedimento de lavagem foi repetido. Após o processo de lavagem, as nanopartículas foram guardadas no freezer para posterior análise.

3.2.2. Funcionalização das nanopartículas

✓ Funcionalização das NP por acoplamento com EDC/NHS

Para funcionalização direta das partículas com leucina, foi utilizado como agente de ligação superficial o EDC/NHS em condição levemente ácida. Foram medidas aproximadamente 0,004 g de NHS e 0,065 g de EDC em microtubos separados. Após a adição de cada massa foi realizada a solubilização separadamente com 2.000 µL de solução tampão acetato mantida em pH 4,7. Para uma amostra contendo aproximadamente 0,100 g de NP em um microtubo de 2,0 mL foram adicionados 500 µL da solução de NHS e 500 µL da solução de EDC. Uma pequena barra de agitação magnética foi adicionada a este microtubo e, sendo mantido ao abrigo da luz, foi realizada a agitação da suspensão resultante pelo período de 4 horas sobre uma chapa de agitação. Após esse período, a agitação foi suspensa e as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm pelo período de 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante de cada tubo foi descartado (DIAS, 2017).

✓ Funcionalização das NP com leucina

Para adicionar à superfície das partículas o peptídeo, inicialmente foi adicionado 50 µL de DMSO e 950 µL de solução tampão PBS ao frasco contendo 1,0 mg do peptídeo leucina. Em cada microtubo contendo as amostras que seriam funcionalizadas com esse peptídeo, foram adicionados 100 µL da solução de peptídeo e uma pequena barra de agitação magnética. Ao abrigo da luz, foi realizada agitação da suspensão resultante pelo período de 1 hora sobre uma chapa de agitação. As amostras foram então centrifugadas a 3.000 rpm pelo período de 5 minutos sendo, em seguida, o sobrenadante descartado e 100 µL de solução tampão PBS adicionado a cada amostra. Ao final, as amostras foram acondicionadas a -20°C em sistema de refrigeração (DIAS, 2017).

3.2.3. Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas produzidas foram caracterizadas de acordo com métodos bem descritos na literatura. Para a determinação da eficiência de encapsulamento do quimioterápico foram realizados os métodos espectroscópicos, tais como:

espectrofotometria na região do UV-vis, emissão de fluorescência e FTIR. Na determinação do perfil de liberação, *in vitro*, do quimioterápico a partir do material nanoestruturado foi aplicado o método de espectroscopia na região do UV-vis. As análises morfológicas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em que foi avaliada a superfície externa das partículas, sua dimensão e seu estado de agregação.

3.2.3.1. Eficiência de encapsulamento

A concentração total de fármaco é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. A concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre a fração livre e total. Uma técnica muito utilizada é a ultracentrifugação, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão é determinada no sobrenadante após a centrifugação (CAMPOS, 2013).

O doseamento do fármaco encapsulado foi realizado baseando-se na quantidade total empregada no preparo das nanopartículas. Uma alíquota do sobrenadante obtido após a centrifugação das nanopartículas foi retirada para análise, por UV-vis, da concentração de fármaco livre (CAMPOS, 2013).

3.2.3.2. Espectrofotometria na região do UV-vis

Espectros de absorção eletrônica dos sistemas em estudo foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro UV-vis (ultravioleta-visível) de duplo feixe, duplo monocromador, com fotomultiplicador da marca Hitachi[®], modelo 3900H. Adotando nas medidas fenda para passagem de luz 2,0 nm, cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e temperatura constante em 37,0 °C. Antes do início das leituras será obtida a linha de base e em seguida, posicionada a cela contendo a amostra solubilizada ou em suspensão aquosa no compartimento adequado para obtenção das medidas de absorbância por meio do modo de varredura dentro da faixa espectral de 200,0 a 800,0 nm, com velocidade de escaneamento de 1200,0 nm/min (DIAS, 2012). Os dados

obtidos serão tratados com o software UV Solutions 3.0[®] e transferidos para o programa GraphPad Prism 6.05[®].

3.2.3.3. Perfil e cinética de liberação

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para determinar a presença e quantidade do fármaco livre em solução para avaliar sua liberação (BRONZE-UHLE *et al.*, 2017). O perfil de liberação foi determinado para a amostra contendo o fármaco, sem funcionalização, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência. Uma pequena quantidade da amostra foi colocada em um microtubo e adicionado 2000 µL de água destilada. A solução foi transferida para uma cubeta de quartzo e no primeiro dia foi analisado por 2h30 minutos, seguidos, com intervalo de 5 segundos entre cada medida. A análise foi feita durante doze dias com uma medida, da emissão de fluorescência, por dia.

A análise da cinética de liberação da nanopartícula contendo o lapatinibe foi realizada utilizando cinco modelos matemáticos (Tabela 2): ordem zero, ordem um, Higuchi, Hixson-Crowell e Korsmeyer-Peppas.

Tabela 2. Modelos matemáticos para análise da cinética de liberação do fármaco.

Modelo	Equação	Referências
Ordem zero	$Q_t = Q_o + K_o t$	COSTA, 2002; MAHLE <i>et al.</i> , 2007; MANADAS <i>et al.</i> , 2002.
Ordem um	$\log Q_t = \log Q_o + \frac{K_1 t}{2,303}$	
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$	
Hixson-Crowell	$Q_o^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t$	
Korsmeyer-Peppas	$\log \left(\frac{M_{(t-l)}}{M_\infty} \right) = \log a + n \log(t - l)$	

Q_o é a quantidade inicial de fármaco na solução; Q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t ; K_o é a constante de liberação de ordem zero; K_1 é a constante de liberação de ordem um; K_H é a constante de liberação de Higuchi; K_s é uma constante

que incorpora a relação superfície/volume; $M_{(t-l)}/M_{\infty}$ é a liberação fracional do fármaco considerando o tempo de espera (l) no início da liberação do fármaco; a é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica, n é o expoente de liberação (COSTA, 2002; MAHLE *et al.*, 2007; MANADAS *et al.*, 2002).

3.2.3.4. Tamanho e índice de polidispersão

Para realizar a caracterização dos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico médio, distribuição de tamanho e potencial zeta foi utilizado um equipamento de espalhamento dinâmico de luz modelo Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments[®]. O equipamento possui como fonte de luz um laser vermelho de 5 mW, He-Ne, com comprimento de onda de 633,0 nm. As medidas foram realizadas com o detector posicionado no ângulo fixo de 173° em relação ao ângulo de incidência. Para realização das medições, 1000 µL da solução contendo a amostra foram transferidos para uma cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico. Para cada amostra preparada foram realizadas três medidas de tamanho e PDI (do inglês, Poly Dispersity Index), sendo que, para cada medida, foram executadas 11 leituras (DIAS, 2012). Os dados foram coletados a 25,0 °C e tratados com o programa Zetasizer 6.20[®].

3.2.3.5. Potencial zeta

Para determinar o potencial zeta das nanopartículas, 1000 µL da suspensão coloidal preparada para medida de diâmetro hidrodinâmico e PDI, foram transferidos para uma célula eletroforética e as medidas foram realizadas utilizando o mesmo aparelho (Zetasizer Nano ZS), alterando a configuração do equipamento do modo size para o modo zeta (DIAS, 2012). Como anteriormente, os dados foram coletados a 25,0 °C e tratados com o programa Zetasizer 6.20[®].

3.2.3.6. Análise morfológica

Para realização das medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), aproximadamente 0,0010 g de NP foi transferido para um microtubo e suspenso com

900 μL de água ultrapura com o homogeneizador mecânico (T10) em seu nível 6 de velocidade (~ 30.000 rpm) pelo período de 1 minuto. Em uma lamínula circular limpa e esterilizada foram depositados 30,0 μL dessa suspensão. Em seguida, esse material foi introduzido no interior de um dessecador a temperatura ambiente e pressão reduzida por 24 horas. Optou-se por não realizar qualquer tipo de fixação química adicional. Após desidratação, a lamínula foi fixada com fita adesiva condutora dupla face sobre um suporte de alumínio (stub). Devido à baixa condutividade elétrica das NP, uma fina camada de ouro (~ 40 nm de espessura) foi depositada revestindo as amostras por um processo de metalização em atmosfera de argônio. Esse procedimento foi realizado utilizando um equipamento da marca Balzers[®], modelo SCD-050. As amostras foram examinadas e fotografadas nos aumentos entre 15.000 e 40.000 vezes, operado em tensão de aceleração de 10-20 kV no modo de detecção de elétrons retroespalhados (BSED).

3.2.3.7. Emissão de fluorescência

Espectros de fluorescência foram obtidos para os compostos em estudo utilizando-se um espectrofotômetro modelo F-7000 da marca Hitachi[®]. Os registros foram realizados utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, contendo o meio em estudo (soluções ou suspensões). Os espectros foram registrados de maneira a cobrir uma faixa espectral de 200,0 a 800,0 nm, sob temperatura ambiente, escaneamento com velocidade de 1.200,0 nm/min e janelas de emissão e excitação com 5,0 nm de abertura (DIAS, 2012). Os dados foram tratados com o software FL Solutions 2.1[®] e transferidos para o programa de construção de gráficos GraphPad Prism 6.05[®].

3.2.3.8. Espectrometria no infravermelho por transformações de Fourier

Espectros de infravermelho das diversas amostras produzidas e reagentes utilizados foram obtidos utilizando um espectrofotômetro FTIR (do inglês, Fourier Transform Infrared), modelo IR Prestige 21 da marca Shimadzu[®]. Para leitura foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) com massa média de 70,0 mg preparadas com aproximadamente 2,5% (que equivale a 1,750 mg) de amostra, prensadas a 80,0 KN pelo período de 3,0 minutos. Para cada leitura foram obtidos 40

registros, com resolução de $4,0 \text{ cm}^{-1}$ na região compreendida entre 400 e 4.000 cm^{-1} no modo de porcentagem de transmitância (DIAS, 2012). Os dados foram tratados com o software IR Solution 1.50[®] e transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism 6.05[®].

4. Resultados e discussão

4.1. Produção e funcionalização de nanopartículas

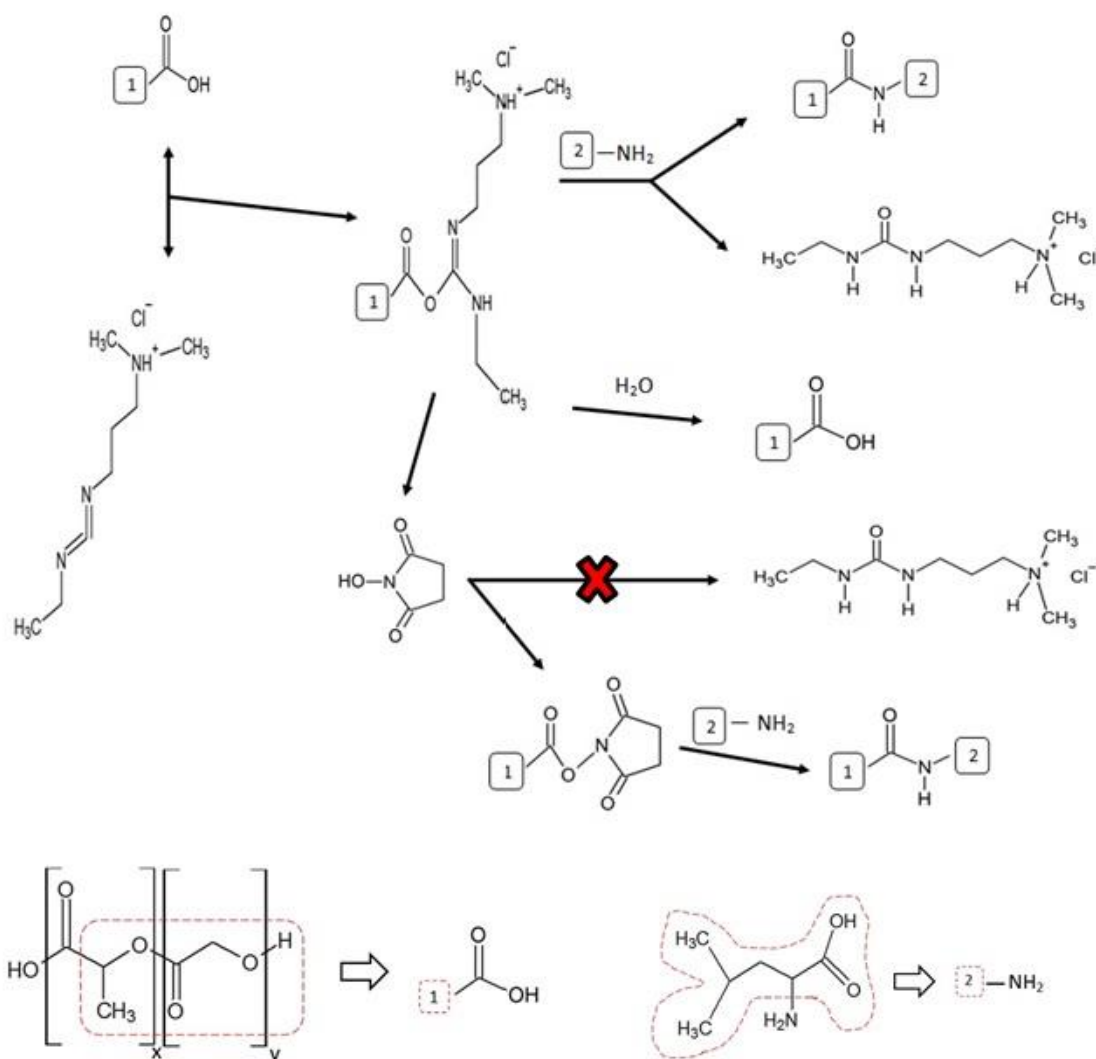
No preparo das nanopartículas foi utilizado o método de evaporação do solvente (RAMOS, 2018), após o gotejamento da fase orgânica sobre a fase aquosa, foi observado o surgimento de uma solução turva devido à formação de uma suspensão de nanopartículas. Em seguida essa solução foi levada para agitação em que ocorreu a evaporação do solvente orgânico e como consequência houve uma diminuição no volume da solução. E por fim, a solução resultante foi centrifugada para que as nanopartículas precipitassem. Esta solução por sua vez foi lavada para a remoção do excesso de surfactante (PVA).

A abordagem geral para conferir as capacidades de direcionamento ativo de nanopartícula é funcionalizar a superfície das mesmas com ligante específico já que estes carreadores objetivam liberar o fármaco próximo ao sítio de ação, protegendo a substância ativa da rápida degradação e eliminação possibilitando a redução da dose e evitando efeitos colaterais. As nanopartículas poliméricas, ao serem comparadas a outros sistemas de carreadores de fármacos, oferecem a possibilidade de encapsular vários tipos de moléculas e protege-las da degradação enzimática (GARCIA, 2011).

Para o procedimento de funcionalização das nanopartículas, foi proposto o mecanismo apresentado na Figura 7.

O EDC reage com o grupo carboxil do PLGA, formando um intermediário (O-acilisouréia), que é facilmente removido por um ataque nucleofílico das amins primárias da leucina. A amina primária forma uma ligação amida com o carboxil e o subproduto de EDC é liberado em forma de um derivado solúvel de uréia (chamado de isouréia) (LOPES, 2012; PEPINO, 2016).

Figura 7. Reação química entre os grupos do ácido carboxílico (do PLGA) e amina (da leucina) ativada por EDC e estabilizada por NHS.



Fonte: Autoria própria.

O NHS é adicionado para aumentar a eficiência da conjugação e permitir que ela ocorra em pH fisiológico. O EDC favorece a ligação dos grupos carboxil com o NHS, formando um éster de NHS que é mais estável que o O-acilisouréia, permitindo uma conjugação mais eficiente e uma ligação amida estável (JANEGITZ, 2012; LOPES, 2012). A inserção de NHS resultou em um maior rendimento da reação de amidação, pois não ocorreu a formação dos subprodutos indesejáveis. Contudo, os grupamentos carboxila não podem ser ativados diretamente com NHS, sendo necessária a presença de carbodiimida para iniciar a reação (RIBEIRO, 2013).

Em solução aquosa, o intermediário O-acilisourea é suscetível à hidrólise, a qual resulta na regeneração do grupo carboxil, minimizando a formação de grupos amidas (PEPINO, 2016).

Segundo Ramos (2018), a literatura mostra que a reação de ativação dos grupos carboxílicos ocorre preferencialmente na faixa de pH entre 3,5 e 4,5 enquanto a formação da ligação amida ocorre na faixa de pH entre 4 e 6. Entretanto, a hidrólise máxima do EDC ocorre em meio ácido e a solução torna-se estável em pH maior que 6,5. Assim, de acordo com dados prévios reportados pela literatura o pH ideal para utilização do EDC situa-se entre 4,5 e 7,5.

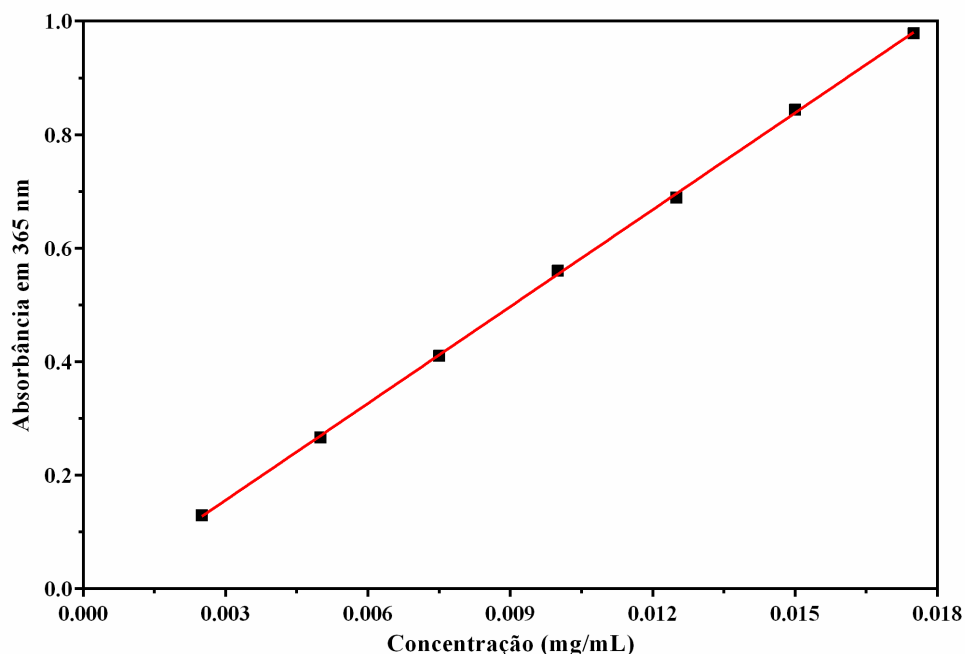
Quando proteínas e peptídeos são empregados, a formação da ligação amida mediada por EDC, apresenta rendimento satisfatório com o pH do meio no intervalo de 4,5 a 7,5, mas se o pH do meio reacional se encontra fora da faixa preconizada o processo de acoplamento ocorre lentamente e com baixo rendimento (GONÇALVES BRASIL JÚNIOR, 2010).

A formação de uma amida utilizando uma carbodiimida (EDC) é direta, mas com várias reações laterais que tornam a reação mais complexa. O ácido carboxílico reagirá com carbodiimida para produzir o intermediário chave: O-acilisourea, que pode ser considerado um éster carboxílico com um grupo de saída ativado (MONTALBETTI E FALQUE, 2005). O O-acilisourea reage com uma amina primária para formar uma ligação amida com a libertação de um derivado de ureia solúvel (MATTSON *et al.*, 1993; MONTALBETTI e FALQUE, 2005).

4.2. Eficiência de encapsulamento

Como o lapatinibe é insolúvel em água então inicialmente foi realizada a solubilização em uma parte de dimetilsulfóxido (DMSO) e o volume foi completado com nove partes de água destilada. Para a elaboração da curva de calibração (Figura 8), o comprimento de onda de máxima absorção considerado foi de 365 nm no intervalo de concentração de 0,0025 - 0,0175 mg/mL ($4,30 \times 10^{-8}$ – $3,01 \times 10^{-9}$ mol/L) sendo utilizado sete concentrações diferentes.

Figura 8. Curva de calibração, feita no UV-vis, para determinação da concentração do lapatinibe.



Fonte: Autoria própria.

A equação linear obtida foi $A = 56,88x C - 0,01464$ e o coeficiente de correlação (r^2) foi de 0,9998 indicando uma correlação positiva forte entre a concentração e absorvância. A partir dessa curva foi obtida a equação abaixo utilizada para determinar a concentração da solução de lapatinibe:

$$\text{Concentração (mg/mL)} = \frac{\text{Absorvância} + 0,01464}{56,88}$$

Para a determinação da eficiência de encapsulamento (E.E.) foi utilizada a seguinte equação:

$$E.E. (\%) = \frac{(\text{Quantidade inicial de LPT} - \text{Quantidade de LPT no sobrenadante})}{\text{Quantidade inicial de LPT}} \times 100$$

A eficiência de encapsulamento do fármaco nas nanopartículas foi avaliada pela análise da concentração do sobrenadante, que foi obtido após o processo de

centrifugação, sendo calculada em triplicata e o resultado obtido foi $95,17 \% \pm 0,0007$ %.

Huo *et al.* (2015), que trabalharam com um nanossistema híbrido de polímero-lipídeo carregado com lapatinibe, produziram nanoformulações que consistiam de um núcleo polimérico (poly[lactide-co-glycolide]-*D*- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate [PLGA-TPGS]), que foi então envolvido por uma camada lipídica PEGilada (DSPE-PEG) obtendo uma eficiência de encapsulamento >80%.

No grupo de pesquisa coordenado pelo orientador deste trabalho foi desenvolvido dois trabalhos sobre nanopartículas de PLGA: Dias (2012) na sua dissertação de mestrado desenvolveu um sistema nanoestruturado biodegradável constituído por ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) incorporando várias quantidades de antiplásico clorambucil que apresentou a porcentagem de eficiência de encapsulamento variando entre 48,80 e 94,70%; e na sua tese de doutorado, Dias (2017) desenvolveu o mesmo sistema nanoestruturado incorporando o clorambucil e funcionalizando sua superfície com dois ligantes diferentes (EDC/NHS e DOPA) para acoplar o peptídeo sítio-específico ciclo (Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) apresentando a porcentagem de eficiência de encapsulamento variando entre 86,7 e 89,1%.

4.3. Espectrofotometria na região do UV-vis

Os espectros na região do UV-vis para comprovação do encapsulamento do lalatinibe (LPT) foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 240 a 800 nm, como é mostrado na Figura 9. O espectro do LTP apresentou dois picos com máximo de absorção nos comprimentos de onda de 353 nm ($A = 0,423$) e 261 nm ($A = 0,674$). Uma banda de absorção fraca em torno de 260 nm, com indicações de estrutura vibracional fina, evidenciam a existência de um anel aromático (HOLLER *et al.*, 2009).

Nos espectros UV vis das amostras de NPL e NPLF é possível observar uma pequena elevação no comprimento de onda entre 340 e 400 nm, característica do fármaco indicando assim a presença do LPT nas NPL e NPLF.

Figura 9. Espectros de absorção na região do UV-vis das amostras de LPT (laranja), NPL (azul) e NPLF (rosa).

FIG

Fonte: Autoria própria.

Na comprovação da funcionalização, os espectros de LEU e NPLF foram obtidos no comprimento de onda de 200 a 800 nm, como é mostrado na Figura 10. Segundo Zaia *et al.* (1998), a aplicação do método UV-vis em proteínas é baseado no fato de que elas mostram absorção na região de 280 nm e na região abaixo de 220 nm, sendo a primeira devido a diversos aminoácidos (fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina), e a segunda devido à ligação peptídica presente na estrutura química da proteína.

Figura 10. Espectros de absorção na região do UV-vis das amostras de LEU (lilás), NPL (azul) e NPLF (rosa) para comprovação da funcionalização.

FIG

Fonte: Autoria própria.

4.4. Perfil e cinética de liberação

Para a elaboração da curva de calibração (Figura 11), o comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência considerado foi de 417 nm no intervalo de concentração de 0,01 - 0,08 mg/mL ($344,2 \times 10^{-7}$ – $1376,8 \times 10^{-7}$ mol/L) sendo utilizadas cinco concentrações diferentes.

Figura 11. Curva de calibração, feita no espectro fluorímetro, para determinação da concentração do lapatinibe.

FIG

Fonte: Autoria própria.

A equação linear obtida foi $EF = 39492 \times C - 1232$ e o coeficiente de correlação (r^2) foi de 0,9034 indicando uma correlação positiva forte entre a concentração e a emissão de fluorescência. A partir dessa curva foi obtida a equação abaixo que foi utilizada para determinar a concentração da solução de lapatinibe:

$$\text{Concentração (mg/mL)} = \frac{\text{Emissão de fluorescência} + 1232}{39492}$$

O estudo do perfil de liberação do fármaco a partir das nanopartículas, foi realizado em soluções tampão com pH = 5,0, 6,2 e 7,4. Nos primeiros 180 minutos foram realizadas medidas a cada 5 segundos, conforme mostra a Figura 12, sendo que os valores de emissão de fluorescência foram obtidos no comprimento de onda de 417 nm.

Figura 12. Gráfico da emissão de fluorescência nas primeiras 2 h 30 min (equivalente a 9000 s) com intervalo de 5 segundos entre cada medida sendo realizada 1801 medidas.

FIG

Fonte: Autoria própria.

Durante o período de 12 dias, como mostra a Figura 13, foi avaliada a quantidade de fármaco liberada, a cada 24h, por meio dos valores da emissão de fluorescência da suspensão. A partir do sexto dia foi observada que a emissão de fluorescência atingiu seu valor máximo (187.2), após este período houve pouca variação na intensidade de fluorescência.

Figura 13. Gráfico da emissão de fluorescência do lapatinibe liberado das nanopartículas por hora (min) correspondendo ao período de 12 dias sendo realizadas 162 medidas.

FIG

Fonte: Autoria própria.

Como observado nas Figuras 12 e 13 o lapatinibe foi liberado lentamente, isto pode ser atribuído à sua natureza hidrofóbica, então parece que interações mais hidrofóbicas de LPT com o núcleo das partículas causaram uma liberação mais lenta de LPT (KELISHADY *et al.*, 2014).

Na Tabela 3 são apresentados os valores de emissão de fluorescência e concentração obtidas em seis momentos da análise do perfil de liberação para a nanopartícula contendo o lapatinibe.

Tabela 3. Quantidade de emissão de fluorescência e concentração em seis momentos do ensaio de perfil de liberação para a nanopartícula contendo o lapatinibe.

Tempo	0 h	2 h e 30 min	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias
Emissão de fluorescência	100,7	127,1	156,1	187,2	182,1	177,3
Concentração (mg/mL)	0,0337	0,0344	0,0351	0,0359	0,0358	0,0357

Conforme mostra a Tabela 4, o modelo matemático que melhor se adequou ao gráfico do perfil de liberação (Figura 13) foi o de Higuchi, pois apresentou maior coeficiente de correlação ($R^2 = 0,8746$).

Tabela 4. Valor de R^2 determinado para cada modelo matemático de cinética de liberação do lapatinibe da nanopartícula sem funcionalização.

Amostra*	Ordem zero	Ordem um	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas
NPL	0,7383	0,7098	0,8746	0,7202	0,4767

*NPL – nanopartícula com lapatinibe sem funcionalização.

4.5. Análise morfológica (MEV)

Utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível avaliar a morfologia das amostras NPV, NPL, NPVF e NPLF preparadas pelo método de emulsificação e evaporação do solvente. Na Figura 14 são apresentadas as imagens obtidas para algumas das amostras produzidas neste trabalho. As NP se apresentam esféricas, regulares, pouco porosas, não agregadas, sendo algumas encontradas dipostas de maneira isolada. Na Figura 14 (A e B) são apresentadas as imagens das NPV e NPL, sendo possível observar que a sua superfície é lisa, e sua forma esférica. Na Figura 14 (C e D), que apresenta maior magnificação, é possível identificar que as superfícies das partículas possuem uma forma diferenciada, contendo estrutura no formato de filamentos/pontos devido à presença do agente funcionalizante. Na imagem D, observa-se uma maior coalescência das partículas devido à presença do fármaco lapatinibe.

Figura 14. Morfologia da superfície externa das micropartículas preparadas pelo método de evaporação do solvente. A) NPV com ampliação 15.000 X por MEV. Barra de 5,0 μm . BSED; B) NPL com ampliação 15.000 X por MEV. Barra de 4,0 μm . BSED; C) NPVF com ampliação 40.000 X por MEV. Barra de 1,0 μm . BSED; D) NPLF com ampliação 40.000 X por MEV. Barra de 1,0 μm . BSED.

FIG

Fonte: Autoria própria.

4.6. Tamanho e índice de polidispersão

Carga superficial e tamanho de partícula são os dois fatores mais comumente mencionados que são responsáveis por uma gama de efeitos biológicos de NPs, incluindo captação celular, toxicidade e dissolução; sendo que o DLS (espalhamento dinâmico de luz) e o potencial zeta são técnicas simples para investigar o tamanho (hidrodinâmico) e a carga superficial de NPs (BHATTACHARJEE, 2016).

Os valores da média \pm desvio padrão dos diâmetros hidrodinâmicos, intensidade e de PDI são mostrados na Tabela 5, sendo observada a relação do tamanho com a intensidade da amostra.

Tabela 5. Valores da média \pm desvio padrão do diâmetro hidrodinâmico, intensidade e índice de polidispersão das nanopartículas produzidas.

Amostra*		Diâmetro hidrodinâmico		Intensidade (%)		PDI
		Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2	
A	NPV	374,1 \pm	4999 \pm	96,3 \pm	3,7 \pm 1,50	0,222 \pm
		15,80	295,20	1,50		
B	NPVF	1171 \pm	4699 \pm	76,9 \pm	23,1 \pm	0,402 \pm
		28,99	663,40	15,30	15,30	0,030
C	NPL	366,2 \pm	4639 \pm	87,4 \pm	12,6 \pm	0,397 \pm
		53,84	738,60	10,00	10,00	0,010
D	NPLF	689,2 \pm	5102 \pm	96,8 \pm	3,1 \pm 0,90	0,252 \pm
		30,16	230,80	1,10		

*NPV – nanopartícula vazia sem funcionalização; NPVF – nanopartícula vazia funcionalizada; NPL – nanopartícula com lapatinibe sem funcionalização; NPLF – nanopartícula com lapatinibe funcionalizada.

Ao comparar o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas (Figura 15) com e sem funcionalização, para o pico 1 que apresentou maior porcentagem de intensidade, foi observada uma diferença significativa no tamanho médio. Para as nanopartículas vazias com e sem funcionalização foi observado que houve um aumento de 213,02% quando funcionalizadas. E as nanopartículas com o fármaco ao serem funcionalizadas aumentaram 88,20%.

Segundo Huo *et al.* (2015), partículas com tamanho abaixo de 200 nm são adequadas para captação por células do câncer e nanopartículas com tamanho entre 100-200 nm são relatadas para acumular preferencialmente nos tecidos cancerosos através de maior permeação e efeito de retenção (EPR).

Figura 15. Gráficos do tamanho em função da intensidade das nanopartículas: (A) NPV, (B) NPVF, (C) NPL e (D) NPLF.

FIG

Fonte: Autoria própria.

O PDI para DLS tipicamente mostra a intensidade da luz espalhada por várias frações das partículas diferindo em seus tamanhos e é calculada por $(\text{largura}/\text{média})^2$ para cada pico (BHATTACHARJEE, 2016). As nanopartículas foram classificadas segundo os dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Classificação das partículas baseado no seu valor de PDI.

PDI	Classificação	Referência bibliográfica
$\leq 0,1$	altamente monodisperso	BHATTACHARJEE, 2016
0,1-0,4	moderadamente polidisperso	
$>0,4$	altamente polidisperso	

Como os valores de PDI estão variando entre 0,204 a 0,432 isso indica que os sistemas são polidispersos para todas as amostras analisadas. O valor de PDI para a NP vazia funcionalizada foi 81,08% maior em comparação com a NP vazia sem funcionalização. Já a nanopartícula com o lapatinibe sem funcionalização apresentou um aumento de 57,54% em comparação com a funcionalizada.

A agregação de nanopartículas de PLGA durante o processo de evaporação de solvente é um problema notável, independente do método de preparação e para evitar essa agregação são utilizados estabilizadores de polímeros com, por exemplo, álcool polivinílico (PVA), poli (vinilpirrolidona) (PVP), Tween 80 dentre outros (CHENG *et al.*, 2008). Neste trabalho as nanopartículas de PLGA foram preparadas pelo método de simples emulsão e evaporação do solvente sendo utilizado o PVA como estabilizante.

A parte hidrofóbica do PVA é que fica ancorada à matriz polimérica do PLGA, após a evaporação do solvente orgânico. A interação das cadeias poliméricas do PVA na interface aquosa-orgânica induz a redução na tensão interfacial, aumentando a estabilização das áreas interfaciais associadas às emulsões (SILVA, 2007).

Estes estabilizadores são revestidos na superfície de nanopartícula de PLGA e podem afetar o potencial zeta, tamanho de partícula e propriedades da superfície da partícula. No entanto, embora os estabilizadores de polímeros possam impedir a agregação de nanopartículas, eles são difíceis de serem removidos mesmo por lavagem completa (CHENG *et al.*, 2008).

Segundo Silva (2007), o aumento da velocidade de agitação também induz a diminuição no tamanho das partículas poliméricas, ou seja, quanto maior a velocidade de agitação, maior será a dispersão da fase orgânica na fase aquosa e menor o tamanho das gotículas da fase orgânica dispersa em solução, fato que acarreta a geração de partículas com diâmetros menores após a evaporação do solvente.

Embora alguns trabalhos relatem que o PVA seja não-biodegradável e potencialmente cancerígeno, pesquisas têm mostrado que o PVA é um excelente material para uso em aplicações médicas, tais como em sistema de liberação de fármaco, devido sua biocompatibilidade e sendo que a toxicidade do PVA não está associada a sua estrutura, mas a sua massa molar (SILVA, 2007).

4.7. Potencial zeta

O potencial zeta, também denominado como potencial eletrocinético, é o potencial no plano de deslizamento/cisalhamento de uma partícula coloidal que se move

sob campo elétrico (BHATTACHARJEE, 2016). Dados da literatura classificam as dispersões com valores de potencial zeta conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7. Classificação das nanopartículas conforme o seu valor de potencial zeta.

Potencial zeta	Classificação	Referência bibliográfica
$\pm 0-10$ mV	altamente instáveis	BHATTACHARJEE, 2016
$\pm 10-20$ mV	relativamente estáveis	
$\pm 20-30$ mV	moderadamente estáveis	
$> \pm 30$ mV	altamente estáveis	

Conforme mostram os resultados apresentado na Tabela 8, as nanopartículas obtidas estão relativamente estáveis.

Tabela 8. Valores da média \pm desvio padrão do potencial zeta das nanopartículas.

Amostra*		Potencial zeta (ζ)
A	NPV	$-14,0 \pm 0,850$
B	NPVF	$11,9 \pm 0,351$
C	NPL	$-11,2 \pm 0,100$
D	NPLF	$9,7 \pm 0,315$

*NPV – nanopartícula vazia sem funcionalização; NPVF – nanopartícula vazia funcionalizada; NPL – nanopartícula com lapatinibe sem funcionalização; NPLF – nanopartícula com lapatinibe funcionalizada.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso adquire carga na superfície, principalmente por ionização de grupos ou adsorção de espécies carregadas. As cargas das superfícies modificam a distribuição dos íons na interface, resultando em

uma camada ao redor da partícula da solução. O potencial zeta é uma das principais forças que medem as interações interpartículas (LIMA, 2018).

Na avaliação da carga superficial de nanopartículas as dimensões positivas ou negativas de potencial zeta são determinadas pela identificação de qual eletrodo as partículas estão se movendo em direção durante a eletroforese (BHATTACHARJEE, 2016).

Geralmente, valores negativos de potencial zeta são esperados para partículas de PLGA devido à presença dos grupos carboxílicos localizados nas cadeias poliméricas do poliéster (SILVA, 2007; LIMA, 2018). Neste trabalho as nanopartículas sem funcionalização apresentam potencial zeta negativo.

Segundo Baldim (BALDIM, 2011), nanopartículas negativamente carregadas são rapidamente opsonizadas quando na corrente sanguínea e, conseqüentemente, eliminadas por macrófagos. Além disso, o processo de internalização celular destas estruturas é dificultado pela repulsão eletrostática entre as mesmas e a superfície da membrana celular, composta majoritariamente de cabeças polares de fosfolídeos negativamente carregadas. Neste sentido, dispositivos com carga superficial positiva prometem melhores resultados (BALDIM, 2011). Então ao ser funcionalizada com a leucina a nanopartícula de PLGA, produzida neste trabalho, apresentou carga superficial positiva.

4.8. Emissão de fluorescência

Na Figura 16 são apresentados os espectros das amostras de lapatinibe (LPT), nanopartícula com lapatinibe sem funcionalização (NPL) e nanopartícula com lapatinibe funcionalizada (NPLF).

Figura 16. Espectros, normalizados, de emissão de fluorescência das amostras de LPT (laranja), NPL (azul) e NPLF (rosa).

FIG

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 9 mostra os valores dos comprimentos de onda em que ocorre a máxima emissão, quando excitado em 365 nm, e sua respectiva intensidade dos espectros mostrados na figura.

Tabela 9. Comprimentos de máxima emissão e intensidade dos espectros de lapatinibe e das nanopartículas com o lapatinibe.

Amostras	Comprimento de máxima emissão	Intensidade de emissão
LPT	447 nm	2621
NPL	435 nm	3244
NPLF	423 nm	3039

*LPT – lapatinibe; NPL – nanopartícula com lapatinibe sem funcionalização; NPLF – nanopartícula com lapatinibe funcionalizada.

Analisando a figura e a tabela é possível verificar que ocorreu o encapsulamento do lapatinibe nas nanopartículas de PLGA, pois as NPL e NPLF apresentam uma intensidade bastante alta e que é característica da presença do fármaco. Na nanopartícula funcionalizada houve o deslocamento de 24 nm no pico do espectro, quando comparado ao espectro do lapatinibe, indicando que a leucina está ligada na nanopartícula comprovando assim a funcionalização.

Todas as amostras foram excitadas no comprimento de onda de 365 nm (referente ao comprimento de máxima absorção do lapatinibe no espectro do UV-vis) apresentando emissão de fluorescência variando entre 400 e 500 nm.

Nos estudos espectroscópicos desenvolvidos por Wilson (WILSON *et al.*, 2015), o lapatinibe foi excitado no comprimento de onda de 370 nm usando BSA e PBS e a emissão ocorreu entre 400 e 500 nm.

4.9. Espectrometria no infravermelho por transformações de Fourier

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica de caracterização essencial e crucial para elucidar a composição química da estrutura e o arranjo de ligação em

materiais compostos e poliméricos de homopolímero, copolímero e polímero (SINGH *et al.*, 2014).

Os espectros FTIR avaliados neste trabalho foram os seguintes: lapatinibe (LPT), nanopartícula com lapatinibe sem funcionalização (NPL), nanopartícula com lapatinibe funcionalizada (NPLF), nanopartícula vazia sem funcionalização (NPV), nanopartícula vazia funcionalizada (NPVF) e leucina (LEU).

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi empregada para a comprovação da interação do fármaco com a matriz polimérica (Figura 17) e da funcionalização das nanopartículas (Figura 18). Os resultados encontram-se detalhados na Tabela 10.

Os espectros de FTIR das amostras de NPV e NPL apresentaram picos e bandas de absorção característicos similares, uma vez que eles possuem basicamente os mesmos grupos funcionais, com pequenas diferenças entre as intensidades.

Na Figura 17 temos os espectros do fármaco e das nanopartículas contendo os fármacos (com e sem funcionalização) para comprovação do encapsulamento do lapatinibe nas nanopartículas. O encapsulamento pode ser confirmado nas seguintes bandas: 1500 cm^{-1} ao C=C (anéis aromáticos); 1453 cm^{-1} ao C-H; 1390 cm^{-1} ao C-H; 1130 cm^{-1} ao C-O (do éter); 750 cm^{-1} ao C-C. Então o encapsulamento foi confirmado pela presença de cinco bandas características do lapatinibe.

Figura 17. Espectros, normalizados, obtidos por FTIR das seguintes amostras: LPT (laranja), NPL (azul), NPLF (rosa) e NPV (vermelho) para análise do encapsulamento do fármaco.

FIG

Fonte: Autoria própria.

Figura 18. Espectros, normalizados, obtidos por FTIR das seguintes amostras: LEU (lilás), NPF (verde), NPLF (rosa) e NPV (vermelho) para análise da funcionalização das nanopartículas.

FIG

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 18 são apresentados os espectros da leucina e das nanopartículas funcionalizadas (vazia e com o fármaco) para comprovação da funcionalização. A funcionalização pode ser confirmada nas seguintes bandas: 1360 cm^{-1} atribuída ao

grupamento C-H (LEU, NPVF e NPLF); 1082 cm^{-1} devido ao O-H (LEU e NPVF); 705 cm^{-1} ao C-C (LEU e NPLF); e 669 cm^{-1} ao COO^- (LEU e NPLF).

Segundo Singh *et al.* (SINGH *et al.*, 2014), os picos de FTIR para grupos funcionais do PLGA correspondem as seguintes bandas: 3450-3500 cm^{-1} ao grupo O-H; 2885-3010 cm^{-1} ao estiramento C-H; 1762,6 cm^{-1} ao estiramento C=O; 1089-1186 cm^{-1} ao estiramento C-O; e 850-1450 cm^{-1} ao dobramento C-H.

No espectro FTIR da leucina as bandas largas entre 3400 e 2300 cm^{-1} são devidas à sobreposição das vibrações de alongamento NH e CH dos grupos NH_3^+ e alquila (alcano que perde um H), respectivamente. O pico de absorção intenso em torno de 1584 cm^{-1} é devido ao modo de vibração de estiramento assimétrico COO^- e o estiramento simétrico do grupo COO^- é observado em 1407 cm^{-1} . O pico a 1512 cm^{-1} é uma deformação simétrica de NH_3^+ . A vibração de C-COO é indicada a 1237 cm^{-1} . O pico a 1078 cm^{-1} e a banda de intensidade média em 1137 cm^{-1} são atribuídos à vibração de estiramento C-N (BASKARAN *et al.*, 2016).

A absorção correspondente ao estiramento de C-H de alcanos ocorre na região de 3000 a 2840 cm^{-1} (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2010). Como diversas bandas podem aparecer na região de estiramento C-H, então as vibrações de dobramento C-H são, com frequência, mais úteis para determinar se um grupo metila ou metileno estão presentes em uma molécula. A presença de grupos metila e metileno, quando não encoberta por outras absorções, podem ser determinadas pela análise da região entre 1465 e 1370 cm^{-1} (PAVIA *et al.*, 2010). Nas amostras de NPL, NPV e NPLF o estiramento C-H aparece nos picos 3002 e 2955 cm^{-1} . E nas amostras de LPT, NPL, NPLF e NPV em 1453 cm^{-1} ocorre uma absorção de dobramento de CH_2 (grupo metileno) e em 1390 cm^{-1} de CH_3 (grupo metila).

As ligações duplas em anéis, por serem frequentemente simétricas ou quase simétricas, absorvem com menor intensidade do que aquelas que não estão em anéis. As bandas de estiramento C=C em anéis aromáticos normalmente aparecem entre 1600 e 1450 cm^{-1} fora da faixa normal onde o C=C aparece em alcenos (PAVIA *et al.*, 2010). A absorção da ligação dupla interna dos sistemas ciclo-hexeno possui vibração de deformação axial da ligação C=C acoplada com a vibração de deformação axial das ligações C-C adjacentes correspondendo ao pico 1566 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*,

2010). Como pode ser observado no espectro do lapatinibe, os picos 1600, 1568, 1525 e 1500 cm^{-1} correspondem ao estiramento C=C (de anéis aromáticos).

As bandas mais importantes e que dão mais informações sobre a estrutura dos compostos aromáticos são encontradas na região de baixas frequências, entre 900 cm^{-1} e 675 cm^{-1} . A banda de absorção que aparece frequentemente entre 600 e 420 cm^{-1} no espectro de derivados de benzeno é atribuída à deformação angular fora do plano do anel (SILVERSTEIN *et al.*, 2010). Como podem ser observados no espectro do lapatinibe os picos em 960, 928, 847, 790, 690, 661, 630, 483 e 446 cm^{-1} .

As ligações C-H em alcenos, ao absorverem radiação no infravermelho, podem vibrar por dobramento tanto no plano quanto fora dele e ocorre em aproximadamente 1415 cm^{-1} com uma absorção de média a fraca (PAVIA *et al.*, 2010). Como pode ser observado no espectro do lapatinibe no pico 1418 cm^{-1} .

Pode ser difícil usar as bandas de estiramento C-H para diferenciar entre alcenos e compostos aromáticos por aparecerem na mesma faixa (PAVIA *et al.*, 2010).

A absorção mais característica do espectro dos éteres alifáticos é uma banda intensa que ocorre entre 1150 e 1085 cm^{-1} e é devida à deformação axial assimétrica de C-O-C. Essa banda aparece usualmente em torno de 1125 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 2010). Já Pavia *et al.* (2010) dizem que o éter alifático apresenta ao menos uma banda C-O na faixa de 1300 a 1000 cm^{-1} e gera uma banda forte em aproximadamente 1120 cm^{-1} . Essa banda forte pode ser observada nas amostras LPT, NPL, NPLF e NPV no pico 1130 cm^{-1} . A banda C-O pode ser observada nos seguintes picos: 1220, 1178, 1060 e 1022 cm^{-1} no espectro do LPT; 1176 no espectro da NPLF; 1090 cm^{-1} nos espectros NPL, NPV e NPLF; e 994 cm^{-1} no espectro da NPVF. O espectro de éteres simples é muito similar ao do alceno (PAVIA *et al.*, 2010).

O grupo carbonila (C=O) está presente em aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres e amidas. Esse grupo absorve com muita intensidade entre 1870 e 1540 cm^{-1} em razão de sua grande mudança no momento de dipolo e apresenta uma forte absorção em 1760 cm^{-1} (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2010). Essa banda não varia muito de posição, é muito intensa e relativamente livre de interferências, por isso é uma banda de reconhecimento mais fácil do espectro de infravermelho (SILVERSTEIN *et al.*, 2010). Como pode ser observada a presença da carbonila, em um éster, nas amostras de NPL,

NPV e NPLF no pico 1760 cm^{-1} ; NPVF nos picos em 1690 e 1770 cm^{-1} ; NPLF no pico 1620 cm^{-1} .

A característica mais marcante do espectro de um ácido carboxílico (COOH) é a absorção O-H extremamente larga que ocorre na região de 3400 a 2400 cm^{-1} . A absorção frequentemente encobre as vibrações de estiramento C-H que ocorrem na mesma região (PAVIA *et al.*, 2010). Podendo ser observado nas seguintes bandas: 3002 e 2955 cm^{-1} para NPL, NPV e NPLF; 2958, 2875 e 2620 cm^{-1} para LEU; 2795, 2630 e 2500 cm^{-1} para NPVF.

Aminas secundárias, $\text{R}_2\text{N-H}$, apresentam uma única banda, fraca, de estiramento N-H entre 3500 a 3300 cm^{-1} (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2010) e uma amina secundária aromática gera uma banda N-H mais forte próxima de 3400 cm^{-1} (PAVIA *et al.*, 2010). Como pode ser observado no espectro do lapatinibe que apresenta o pico 3370 cm^{-1} .

Estiramento C-N ocorre na faixa de 1350 a 1000 cm^{-1} segundo Pavia *et al.* (2010) e entre 900 e 1300 cm^{-1} de acordo com Holler *et al.* (2009). Nas amostras LEU, NPVF e NPLF esse estiramento é identificado no pico 1360 cm^{-1} para amina primária.

O estiramento C-Cl (forte) em cloretos alifáticos ocorre em 785-540 cm^{-1} segundo Pavia *et al.* (2010) e entre 850 e 550 cm^{-1} segundo Silverstein *et al.* (2010). No espectro do lapatinibe esse estiramento aparece em 690 cm^{-1} .

De acordo com Pavia *et al.* (2010), o estiramento S=O, uma banda forte, ocorre próximo de 1050 cm^{-1} . No espectro do lapatinibe esse estiramento é observado em 1060 cm^{-1} .

Na Tabela 10 são sumarizados os máximos de transmitância dos sistemas em estudo com seu respectivo grupo funcional.

Tabela 10. Bandas de absorção no FTIR observadas para as amostras.

Pico (cm^{-1})	Espectro						Grupo funcional	Referências bibliográficas Tabela
	LPT	NPL	NPV	Leu	NPVF	NPLF		
3751					X		O-H, C-H	PAVIA <i>et al.</i> , 2010
3744				X				
3370	X						NH (amina secundária)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
3100					X		-CO-OH (Ácido carboxílico)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; PAVIA <i>et al.</i> , 2010

3065					X			
3002		X	X			X	C-H (alcano)	SINGH <i>et al.</i> , 2014; SINGH <i>et al.</i> , 2015; PAVIA <i>et al.</i> , 2010 SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2010
							-CO-OH (Ácido carboxílico)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
2958				X			C-H (alcano); N-H (amina primária)	KUMAR, 2011; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017; HOLLER <i>et al.</i> , 2009.
2955		X	X			X	C-H (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; SINGH <i>et al.</i> , 2014; SINGH <i>et al.</i> , 2015; PAVIA <i>et al.</i> , 2010 SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2010
							-CO-OH (Ácido carboxílico)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009;
2875				X			C-H (alcano); N-H (amina primária)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
2795					X		-CO-OH (Ácido carboxílico)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; PAVIA <i>et al.</i> , 2010
2630					X		C-H (alcano)	
2620				X			C-H (alcano) N-H (amina primária)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
2500					X		-CO-OH (Ácido carboxílico) C-H (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; PAVIA <i>et al.</i> , 2010
2350				X			C-H (alcano) N-H (amina primária)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
2300				X				
2131				X			Combinação de dois modos fundamentais (1134+1005)	KUMAR, 2011
1986					X		C-H (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1770					X		C=O (éster)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; PAVIA <i>et al.</i> , 2010
1760		X	X			X		HOLLER <i>et al.</i> , 2009; HOLZ, 2011; SINGH <i>et al.</i> , 2014
1690					X			HOLLER <i>et al.</i> , 2009; PAVIA <i>et al.</i> , 2010
1620						X		HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1600	X						C=C (anéis aromáticos)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009

1584				X			COO ⁻	KUMAR, 2011; BASKARAN <i>et al.</i> , 2016; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1568	X						C=C (anéis aromáticos);	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1525	X						COO ⁻ (ácido carboxílico); C-H (alcano)	
1525					X			
1515				X			NH ₃ ⁺ (amina primária)	BASKARAN <i>et al.</i> , 2016; HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
1500	X	X				X	C=C (anéis aromáticos)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1485					X		COO ⁻ (ácido carboxílico)	
1476				X			NH ₃ ⁺ (amina primária)	
1453	X	X	X			X	C-H (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; PAVIA <i>et al.</i> , 2010
1445					X			HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1430		X	X			X	C-H (Alcano); -CO-OH (Ácidos carboxílicos)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1418	X						C-H (alceno)	
1407				X			C-H (alcano)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
							COO ⁻ (ácido carboxílico)	BASKARAN <i>et al.</i> , 2016; HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
1393					X		COO ⁻ (ácido carboxílico); éter	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1390	X	X	X			X	C-H (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; PAVIA <i>et al.</i> , 2010
1360				X	X	X	CH (alcano)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
							CN (amina primária)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; PAVIA <i>et al.</i> , 2010; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
1325					X		COO ⁻ (ácido carboxílico); éter	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1316				X			CH (alceno)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2016
1296				X			NH (amina primária)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1288	X						Anel aromático- NH-R (amina secundária)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1278		X	X			X	COOH (ácidos)	

							carboxílicos)	
1238				X			COOH (ácidos carboxílicos)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2016
							NH ₃ ⁺ (amina primária)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
1220	X						C-O (éter)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1194					X		OH	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2010; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1187				X			C-N (amina primária)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
							C-O (éter)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2016; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
1178	X						C-O (éter)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; SINGH <i>et al.</i> , 2014
1176					X			
1146					X		OH	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2010; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1135				X			C-C (alcano)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
							C-N (Amina primária)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2016
1130	X	X	X			X	C-O (éter)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; SINGH <i>et al.</i> , 2014
1090		X	X			X	C-O (éter); C-H (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; SHI <i>et al.</i> , 2018; HOLZ, 2011; SINGH <i>et al.</i> , 2014
1082				X	X		OH	SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 2010; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1060	X						S=O (sulfona); C-O (éter)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
1030				X			C-C (alcano); C-N (amina primária)	
1022	X						C-O (éter)	
1003				X			C-N (amina primária)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
994					X		CH ₂ -O-CH ₂ (éter); C-H (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; SINGH <i>et al.</i> , 2014
962					X			
960	X						Anel aromático	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
959						X	CH ₂ -O-CH ₂ (éter); C-H (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; SINGH <i>et al.</i> , 2014
943				X			C-C (alcano)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
928	X						C=C (anel aromático)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
918				X			C-C (alcano)	KUMAR, 2011; HOLLER <i>et al.</i> , 2009
889					X		CH ₂ -O-CH ₂	HOLLER <i>et al.</i> , 2009;

870						X	(éter); C-H	SINGH <i>et al.</i> , 2014
851					X		(alcano)	
847	X						Anéis aromáticos	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
845				X			C-C (alcano); C-N (aminas primárias)	
842						X	CH ₂ -O-CH ₂ (éter)	
811					X			
790	X						Anéis aromáticos	
775						X	CH ₂ -O-CH ₂ (éter)	
769				X			C-C=O	
							C-C (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009; BASKARAN <i>et al.</i> , 2017
763						X	CH ₂ -O-CH ₂ (éter)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
750	X	X	X			X	C-C (alcano)	
721						X	CH ₂ -O-CH ₂ (éter)	
705				X		X	C-C (alcano)	
690	X						C-Cl; Anéis aromáticos	
685						X	CH ₂ -O-CH ₂ (éter)	
669				X		X	CO ₂	
661	X						C-Cl; C=C (anel aromático)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
649						X	Éter (CH ₂ -O-CH ₂)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
636				X			C-C (alcano)	
630	X						C=C (anel aromático)	
585						X	CH ₂ -O-CH ₂ (éter)	
570						X		
550						X		
536				X			COO	
525	X						-CH ₂ -O-CH ₂ - (éter); R-SO ₂ -R (sulfona)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009
522						X	CH ₂ -O-CH ₂ (éter)	
483	X						C=C (anel aromático)	
446	X						C=C (anel aromático)	
						X	Alcano	
441				X			NH ₃ (amina primária)	KUMAR, 2011
420						X	C-C (alcano)	HOLLER <i>et al.</i> , 2009

5. CONCLUSÃO

Os objetivos propostos neste trabalho foram alcançados com a produção de nanopartículas de PLGA, contendo o fármaco lapatinibe e funcionalizadas com leucina. Observou-se que o fármaco foi encapsulado eficientemente (%EE = 95,17 %) pelo método de evaporação do solvente. O processo de funcionalização das nanopartículas com leucina foi mediado por meio dos ligantes EDC/NHS e confirmado pelas técnicas de UV-vis e FTIR. Estas partículas apresentaram dimensões de 185,5 e 198,3 nm, sem funcionalização, e de 449,3 e 815,7 nm, funcionalizadas, o que foi observado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. O potencial zeta mostra que as nanopartículas estão relativamente estáveis sendo que as nanopartículas sem funcionalização apresentaram valor negativo e ao serem funcionalizadas apresentaram uma carga superficial positiva. Utilizando a técnica de emissão de fluorescência foi avaliado o perfil de liberação pelo período de 12 dias, sendo observada uma crescente emissão de fluorescência até o sexto dia, do sétimo ao décimo segundo dia não ocorreu uma variação significativa nos valores da IF, devido a saída do composto que se encontra superficialmente ligado a matriz polimérica. A caracterização morfológica das nanopartículas foi avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, tais estruturas mostraram formato esférico, com superfície lisa no caso das partículas sem funcionalização e lisas com pequenas estruturas em sua superfície no caso das NP funcionalizadas. Assim, considerando-se a natureza do fármaco e as características do sistema de liberação podemos inferir que trata-se de um sistema nanoestruturado com possíveis aplicabilidades a terapia de câncer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. D. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.

ARGILES, J. M. *et al.* Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 17, n. 9, p. 789-96, Sep 1 2016.

ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 17, n. 3, p. 247-89, 2006.

BALDIM, Victor. **Nanopartículas poliméricas de PLGA no tratamento de carcinoma hepatocelular e câncer colo-retal**. 2011. 148 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BARROS, Heloise Ribeiro de. **Interação entre nanopartículas de ouro e biomoléculas: estudo físico-químico da interface nano-bio**. 2018. 132 p. Tese (Doutorado em Química) - Setor de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BASKARAN, P. *et al.* Studies on an L-leucine hydriodide semiorganic crystal for frequency conversion applications. **Materials Research Express**, v. 3, n. 3, p. 035101, 2016.

BASKARAN, P. *et al.* Synthesis, growth and characterization of a nonlinear optical crystal: l-Leucinium perchlorate. **Journal of Taibah University for Science**, v. 11, n. 1, p. 11-17, 2017.

BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 36, n. 13, p. R198-R206, 2003.

BERVIAN, P. I.; GIRARDON-PERLINI, N. M. O. A família (con) vivendo com a mulher/mãe após a mastectomia. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 121-128, 2006.

BEZERRA, K. B. *et al.* Qualidade de vida de mulheres tratadas de câncer de mama em uma cidade do nordeste do Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, p. 1933-1941, 2013.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BRITO, L. M. O. *et al.* Conhecimento, prática e atitude sobre o autoexame das mamas de mulheres de uma cidade do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 5, p. 241-246, 2010.

BRONZE-UHLE, E. S. *et al.* Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid. **Nanotechnology, science and applications**, v. 10, p. 11-21, 2017.

BRUM, I. V. *et al.* Câncer de mama metastático: aspectos clinicopatológicos e sobrevida segundo o sítio de metástase. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 50, n. 3, p. 158-168, 2017.

BURSTEIN, H. J. *et al.* Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 10, p. 2722-30, 2001.

CALLE, E. E. *et al.* Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. **The Lancet**, v. 347, n. 9017, p. 1713-1727, 1996.

CAMPOS, Izabella Maria Ferreira. **Preparo e caracterização de nanopartículas de PLGA para liberação de acetato de dexametasona**. 2013. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

CAMPOS, I. M. F.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. **NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA DE FÁRMACO PARA O TRATAMENTO DE ALZHEIMER**. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química e XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química Fortaleza/CE 2016.

CARVALHO, Maria João da Silva Fernandes Leal. **Padrão de metastização das células tumorais da mama**. 2010. 150 f. Tese (Mestrado em Patologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra.

CASPERSON, S. L. *et al.* Leucine supplementation chronically improves muscle protein synthesis in older adults consuming the RDA for protein. **Clinical nutrition**, v. 31, n. 4, p. 512-519, 2012.

CEOLIN, Taíse. **Desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas multiparede contendo ditosilato de lapatinib e complexadas com metal para funcionalização de superfície**. 2016. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559-1564, 2011.

CHENG, F. Y. *et al.* Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 2104-12, 2008.

CIPRIANO, P.; OLIVEIRA, C. Gestação e câncer de mama: proposta de guia de orientações. **Fisioterapia Brasil**, v. 17, n. 2, p. 148-157, 2016.

COMMANDEUR, S.; VAN BEUSEKOM, H. M. M.; VAN DER GIESSEN, W. J. Polymers, drug release, and drug-eluting stents. **Journal of Interventional Cardiology**, v. 19, n. 6, p. 500-506, 2006.

COSTA, P. J. C. Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

CROTTS, G.; PARK, T. G. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. **Journal of microencapsulation**, v. 15, n. 6, p. 699-713, 1998.

DA SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 59-77, 2006.

DEL PINO, P. *et al.* Protein corona formation around nanoparticles—from the past to the future. **Materials Horizons**, v. 1, n. 3, p. 301-313, 2014.

DEMOLINER, L. P.; CORTE, T. W. F. Atenção Farmacêutica para pacientes usuários de lapatinibe. **Revista da Graduação**, v. 3, n. 2, 2010.

DIAS, Diego Juscelino Santos. **Síntese, caracterização físico-química, morfológica e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (MCF-7) submetidas à nanoesferas de PLGA contendo clorambucil**. 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências d Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

DIAS, Diego Juscelino Santos. **Nanopartículas poliméricas contendo clorambucil funcionalizadas com peptídeo direcionador: produção, caracterização e ensaios biológicos com células tumorais**. 2017. 129 f. Tese (Doutorado em Nanociências e Nanobiotecnologia) – Instituto de ciências biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

ECCLES, S.; PAON, L.; SLEEMAN, J. Lymphatic metastasis in breast cancer: importance and new insights into cellular and molecular mechanisms. **Clinical & experimental metastasis**, v. 24, n. 8, p. 619-36, 2007.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

FAVERO, Bianca Cristine. **Efeitos da leucina sobre a via da mTOR e da miostatina em cultura celular de miotúbulos**. 2017. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FEARON, K. *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **The lancet oncology**, v. 12, n. 5, p. 489-495, 2011.

FEARON, K. C. H. Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. **European journal of cancer**, v. 44, n. 8, p. 1124-1132, 2008.

FEBRASGO. *Manual de orientação: Mastologia*. São Paulo: 2010. 216 p.

FERREIRA, A. C. *et al.* Contribuição da ultra-sonografia abdominal no seguimento de pacientes pós-tratamento do câncer mamário. **Radiologia Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 345-349, 2002.

FERREIRA, Daniela Maranhão. **Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra o câncer de pele.** 2012. 93 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FIDLER, I. J.; RADINSKY, R. Search for genes that suppress cancer metastasis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1700-1703, 1996.

FONSECA, A. A. *et al.* Percepções e enfrentamentos de mulheres com câncer de mama: do diagnóstico ao tratamento. **Revista Eletrônica Acervo Saúde/Electronic Journal Collection Health**, v. 5, p. S222-S229, 2017.

FRECHET, J. M. J. Dendrimers and supramolecular chemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 8, p. 4782-4787, 2002.

FRUEHWIRTH, M. *et al.* A suplementação de leucina e o ganho de massa muscular em praticantes de exercício físico. **Revista Digital EFDeportes**, n. 204, 2015.

GALESKA, I. *et al.* Controlled release of dexamethasone from PLGA microspheres embedded within polyacid-containing PVA hydrogels. **The AAPS journal**, v. 7, n. 1, p. E231-240, 2005.

GARCIA, Giani Martins. **Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para direcionamento de fármacos: estudo físico-químico e aplicações no encapsulamento de fármacos anti-*trypanosoma cruzi* e anti-aterogênico.** 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

GEYER, C. E. *et al.* Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. 2733-2743, 2006.

GIOVAGNOLI, M. R. *et al.* Diagnostic and therapeutic path of breast cancer: effectiveness, appropriateness, and costs--results from the DOCMA study. **Clinical interventions in aging**, v. 10, p. 741-749, 2015.

GOMES, Vânia Alexandra Rodrigues. **O cancro da mama metastizado é curável? A propósito de um caso clínico.** 2013. 40 f. Dissertação (Mestrado Integrado em

Medicina) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto.

GOMEZ, H. L. *et al.* A phase II, randomized trial using the small molecule tyrosine kinase inhibitor lapatinib as a first-line treatment in patients with FISH positive advanced or metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 16_suppl, p. 3046-3046, 2005.

GONÇALVES BRASIL JÚNIOR, Aluízio. **Desenvolvimento de processos de bioconjugação empregando pontos quânticos fluorescentes de semicondutores II-VI**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

GONTIJO, I. B. R.; FERREIRA, C. B. Sentimentos de mulheres jovens frente ao diagnóstico de câncer de mama feminino. **Revista Ciência & Saúde**, v. 7, n. 1, p. 2-10, 2014.

GORI, S. *et al.* Retreatment with trastuzumab-based therapy after disease progression following lapatinib in HER2-positive metastatic breast cancer. **Annals of oncology**, v. 23, n. 6, p. 1436-1441, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002.

HESS, K. R. *et al.* Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. **Breast cancer research and treatment**, v. 78, n. 1, p. 105-118, 2003.

HILLERY, A. M.; LLOYD, A. W.; SWARBRICK, J. **Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists**. 1ª edição. London and New York: Taylor & Francis, 2001.

HINES, D. J.; KAPLAN, D. L. Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 3, p. 257-276, 2013.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HOLZ, Juliana Pelisoli. **Preparação de micro e nanoesferas de PLGA com mentol**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HORIE, K. *et al.* Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials (IUPAC Recommendations 2003). **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 889-906, 2004.

HUO, Z. J. *et al.* Novel nanosystem to enhance the antitumor activity of lapatinib in breast cancer treatment: Therapeutic efficacy evaluation. **Cancer science**, v. 106, n. 10, p. 1429-37, 2015.

HUTSON, S. M.; HARRIS, R. A. Introduction. Symposium: Leucine as a nutritional signal. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 3, p. 839S-840S, 2001.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 09/08/2018.

INCA. Câncer de mama: sintomas. 2018a. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/sintomas>>. Acesso em: 09/08/2018.

INCA. Câncer de mama: fatores de risco. 2018b. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1>. Acesso em: 09/08/2018.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, É. A. D.; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 1259-1270, 2011.

IORIO, M. V. *et al.* microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. **Cancer research**, v. 69, n. 6, p. 2195-200, 2009.

JANEGITZ, Bruno Campos. **Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro**. 2012. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

KELISHADY, P. D. *et al.* Pluronic F127 polymeric micelles for co-delivery of paclitaxel and lapatinib against metastatic breast cancer: preparation, optimization and in vitro evaluation. **Pharmaceutical development and technology**, v. 20, n. 8, p. 1009-1017, 2014.

KELSEY, J. L.; GAMMON, M. D.; JOHN, E. M. Reproductive factors and breast cancer. **Epidemiologic reviews**, v. 15, n. 1, p. 36, 1993.

KHAN, S. A. *et al.* Formulation of two-drug controlled release non-biodegradable microparticles for potential treatment of muscles pain and spasm and their simultaneous spectrophotometric estimation. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 299-306, 2010.

KIM, J.-H.; YOON, J.-Y. Protein adsorption on polymer particles. **Encyclopedia of surface and colloid science**, v. 1, p. 4373-4381, 2002.

KIM, M. Y. *et al.* Tumor self-seeding by circulating cancer cells. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1315-1326, 2009.

KREUTER, J. Nanoparticles - a historical perspective. **International journal of pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 1-10, 2007.

KUMAR, S. Spectroscopic studies of valine and leucine molecules a comparative study. **Elixir Vib. Spec**, v. 39, p. 4996-4999, 2011.

LEE, A. L. Z. *et al.* The co-delivery of paclitaxel and Herceptin using cationic micellar nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, n. 5, p. 919-927, 2009.

LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **British journal of cancer**, v. 93, n. 9, p. 1046-52, 2005.

LIMA, Regiane Godoy De. **Síntese e caracterização de nanopartículas poliméricas para veiculação de lignanas bioativas**. 2018. 102 f. Tese (Doutorado em ciências dos materiais) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira.

LIU, J.; PENG, Q. Protein-gold nanoparticle interactions and their possible impact on biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 55, p. 13-27, 2017.

LOPES, Mariana Campos da Paz. **Conjugação de anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário a nanopartículas magnéticas: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer**. 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

LORD, S. J. *et al.* Breast cancer risk and hormone receptor status in older women by parity, age of first birth, and breastfeeding: a case-control study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, v. 17, n. 7, p. 1723-1730, 2008.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nano today**, v. 3, n. 1-2, p. 40-47, 2008.

MAHLE, F. *et al.* Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 265-271, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MARINO, Augusto Ludvik Filip. **Análise do perfil de expressão diferencial de micrornas em carcinomas mamários por microarrays**. 2013. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) - Fundação Pio XII - Hospital do câncer de Barretos, Barretos, Barretos.

MARTINS, L. C. *et al.* Padrão de metástase no câncer de mama triplo negativo. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 27, n. 1, p. 8-14, 2017.

MARTINS, Talita Pereira. **Avanços no diagnóstico do câncer de mama**. 2016. 41 p. Monografia (Graduação em Farmácia), Universidade de Rio Verde, Rio Verde.

MATTSON, G. *et al.* A practical approach to crosslinking. **Molecular biology reports**, v. 17, n. 3, p. 167-83, 1993.

MERLO, L. M. *et al.* Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 12, p. 924-35, 2006.

MERO, A. Leucine supplementation and intensive training. **Sports Medicine**, v. 27, n. 6, p. 347-358, 1999.

MILES, D. W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. **Breast Cancer Research**, v. 3, n. 6, p. 380, 2001.

MILNE, A. C. *et al.* Protein and energy supplementation in elderly people at risk from malnutrition. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 2, 2009.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.

MOURA, S. R. B. *et al.* Fatores de risco e de proteção para o câncer de mama: uma revisão da literatura. **Revista Interdisciplinar UNINOVAFAPI**, v. 5, n. 3, p. 42-45, jul-ago-set 2012.

MOY, B.; GOSS, P. E. Lapatinib: current status and future directions in breast cancer. **The oncologist**, v. 11, n. 10, p. 1047-57, 2006.

MUKHERJEE, S. **O imperador de todos os males: Uma biografia do câncer.** Tradução: Berilo Vargas. São Paulo: companhia das letras, 2010.

MUNDY, G. R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 584-593, 2002.

NICASTRO, H. *et al.* An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 287-300, 2011.

NOGUEIRA, Denise de Almeida Reis. **Adsorção de proteínas na superfície de biomateriais** poliméricos. 1999. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NORMANNO, N. *et al.* Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives. **Endocrine-related cancer**, v. 16, n. 3, p. 675-702, 2009.

PAL, S. K.; PEGRAM, M. HER2 targeted therapy in breast cancer...beyond Herceptin. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 3, p. 269-277, 2007.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 3, p. 329-347, 2003.

PAUL, B.; TROVATO, J. A.; THOMPSON, J. Lapatinib: a dual tyrosine kinase inhibitor for metastatic breast cancer. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 65, n. 18, p. 1703-1710, 2008.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

PEIXOTO, Ana Cristina Bomfim. **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida**. 2013. 193 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PEPINO, Rebeqa de Oliveira. **Desenvolvimento de géis e esponjas de quitosana e blendas quitosana/gelatina em ácido adípico**. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

PEREZ, E. A. *et al.* Cardiac safety of lapatinib: pooled analysis of 3689 patients enrolled in clinical trials. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 6, p. 679-86, 2008.

PIACENTINI, A. B.; MENEZES, H. Recentes aspectos sobre a biologia do câncer e das metástases. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, p. 593-604, 2012.

PICHOT, C. Surface-functionalized latexes for biotechnological applications. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 9, p. 213-221, 2004.

RAMOS, Izabella Maria Ferreira Campos. **Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central**. 2018. 241 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

RENNIE, M. J.; TIPTON, K. D. Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. **Annual review of nutrition**, v. 20, n. 1, p. 457-483, 2000.

RIBEIRO, Daniel André. **Processo de purificação de fator IX recombinante produzido em células da linhagem CHO**. 2013. 158 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ROCHA, Luisa Franciele de Souza. **Fatores associados com não adesão ao tratamento com tamoxifeno em paciente com câncer de mama: um estudo de intervenção da atividade farmacêutica**. 2017. 193 f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde), Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 563-575, 2008.

ROSENDAHL, A. H. *et al.* Caffeine and Caffeic Acid Inhibit Growth and Modify Estrogen Receptor and Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels in Human Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 8, p. 1877-1887, 2015.

ROSS, J. S. *et al.* Standardizing slide-based assays in breast cancer: hormone receptors, HER2, and sentinel lymph nodes. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 10, p. 2831-2835, 2007.

SCALTRITI, M. *et al.* Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 8, p. 628-638, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**. vol. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHAH, S.; CHEN, B. Testing for HER2 in breast cancer: a continuing evolution. **Pathology research international**, v. 2011, 2011.

SHAWVER, L. K.; SLAMON, D.; ULLRICH, A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **Cancer Cell**, v. 1, n. 2, p. 117-123, 2002.

SHI, Y. *et al.* Surface-modified PLGA nanoparticles with chitosan for oral delivery of tolbutamide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, p. 67-72, 2018.

SHIMOMURA, Y.; HARRIS, R. A. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 232S-233S, 2006.

SILVA, André Romero. **Preparação, caracterização e avaliação de nanosferas de PLGA (50: 50) contendo In (III)-Meso-tetrafenilporfirina para aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, Sueli Maria da. **Estudo da interação entre albumina do soro bovino (BSA) e nanopartículas de maghemita (Y-Fe₂O₃) funcionalizadas com três diferentes ligantes aniônicos**. 2017. 133 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SILVEIRA, M. M. C. M. *et al.* **Usos de pelo menos um mirna, kit, métodos de diagnóstico de câncer de mama e métodos para avaliação de risco de metástase**. Brasil. WO2015035480 A1: 69 p. 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Sétima edição. Tradução Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

SINGH, G. *et al.* Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. **International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 30-42, 2014.

SINGH, R. *et al.* Development and characterization of folate anchored Saquinavir entrapped PLGA nanoparticles for anti-tumor activity. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 41, n. 11, p. 1888-1901, 2015.

SLAMON, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177-182, 1987.

SLAMON, D. J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 11, p. 783-792, 2001.

SOARES, A. Q. *et al.* Polímeros Biodegradáveis: Novas perspectivas para as ciências farmacêuticas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 202-205, 2005.

SOLOMAYER, E. F. *et al.* Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis. **Breast cancer research and treatment**, v. 59, n. 3, p. 271-278, 2000.

STEVANOVIC, M. *et al.* An innovative, quick and convenient labeling method for the investigation of pharmacological behavior and the metabolism of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres. **Nanotechnology**, v. 20, n. 33, 2009.

STEVANOVIC, M.; USKOKOVIC, D. Poly (lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins. **Current Nanoscience**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2009.

SUNG, J. C.; PULLIAM, B. L.; EDWARDS, D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. **Trends in biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 563-570, 2007.

TIAN, H. *et al.* Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 237-280, 2012.

TRAN, V. T.; BENOIT, J. P.; VENIER-JULIENNE, M. C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International journal of pharmaceutics**, v. 407, n. 1-2, p. 1-11, 2011.

TSE, J. C.; KALLURI, R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. **Journal of cellular biochemistry**, v. 101, n. 4, p. 816-829, 2007.

VENÂNCIO, J. L. Importância da atuação do psicólogo no tratamento de mulheres com câncer de mama. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 50, n. 1, p. 55-63, 2004.

VENTRUCCI, Gislaine. **Câncer-caquexia e suplementação nutricional: impacto da dieta rica em leucina no controle do metabolismo proteico muscular**. 2005. 53 f.

Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VENTRUCCI, G. et al. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 213-217, 2004.

VERHOEVEN, S. *et al.* Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1468-1475, 2009.

VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2010.

WATANABE, Selma Chiyoko. **Efeitos da suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada para o aumento de massa muscular e redução da gordura corporal: uma revisão sistemática**. 2017. 65 f. Dissertação (Mestrado em Interunidades em Nutrição Humana Aplicada), Universidade de São Paulo, São Paulo.

WILLETT, A. M.; MICHELL, M. J.; LEE, M. J. Best practice diagnostic guidelines for patients presenting with breast symptoms. **Department of health**, 2010.

WILSON, J. N. *et al.* Binding-induced, turn-on fluorescence of the EGFR/ERBB kinase inhibitor, lapatinib. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 17, p. 5006-5011, 2015.

WOLFF, A. C. *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of clinical oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, 2013.

WOLFRAM, J. *et al.* The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 124, p. 17-24, 2014.

WRONSKI, M.; ARBIT, E.; MCCORMICK, B. Surgical treatment of 70 patients with brain metastases from breast carcinoma. **Cancer**, v. 80, n. 9, p. 1746-1754, 1997.

WU, G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 1, n. 1, p. 31-37, 2010.

XIA, W. *et al.* Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. **Oncogene**, v. 23, n. 3, p. 646-653, 2004.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZANCHI, N. E.; NICASTRO, H.; LANCHI, A. H., JR. Potential antiproteolytic effects of L-leucine: observations of in vitro and in vivo studies. **Nutrition & metabolism**, v. 5, n. 20, 2008.

ZANCHI, N. E. *et al.* Suplementação de leucina: nova estratégia antiatrófica? **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 8, n. 1, p. 113-122, 2009.